

# Uspořádání a vyhodnocení ekotoxikologických testů

Klára Hilscherová

RECETOX

[www.recetox.muni.cz](http://www.recetox.muni.cz)

# Pokusné a kontrolní skupiny

- porovnání exponované a kontrolní skupiny ze stejné výchozí populace = stejné organismy /buňky/ za stejných podmínek, liší se jen expozicí
- vždy je nutno do pokusu zahrnout všechny adekvátní kontroly
- negativní a pozitivní kontroly

- **Negativní kontroly**

- = blanky bez jakéhokoli zásahu

- = kontroly se slepým pokusným zásahem

- = všechny rozpouštědlové kontroly

- = pokud kombinace rozpouštědel - všechny kombinace

- Když opakované experimenty prokáží, že používané rozpouštědlo nemá v používané koncentraci žádný vliv na sledované parametry, je možno nadále používat pouze rozpouštědlovou kontrolu.

- **Pozitivní kontroly, Standardy**

- **Pokusné zásahy**

- = různé úrovně pokusného zásahu, různých testovaných faktorů

- = případně spárování kontrol a případů /párové testy jsou silnější/

**Náhodná alokace** organismů z populace do kontrolních a pokusných skupin – před zásahem všechny skupiny stejné = abychom se vyhnuli zkreslení výsledků kvůli rozdílnosti pokusných skupin.

**Opakování experimentu** na větším počtu objektů ke snížení náhodného rozptylu výsledků

- experimentální jednotky = jednotlivá opakování experimentu – např. ryby v sinicové expozici
- opakování pokusného zásahu
- pokud třikrát opakují měření nějakého parametru např. biomarkeru v hepatopankreatu ryby – je to pouze opakování stanovení (technické opakování) pro lepší přesnost a pro stanovení opakovatelnosti měření (nejsou nezávislé hodnoty), ale není to opakování pokusného zásahu

**Opakování** pokusného zásahu na dostatečném počtu experimentálních jednotek, který umožní odhalení systematického účinku  
počet opakování – pokud možno stejný ve všech skupinách - stejný počet pozorování pro každou úroveň znaku  
Pro maximalizaci síly testu je třeba maximalizovat počet nezávislých opakování – Power analysis (analýza síly studie)

## Dostatečná velikost pokusného souboru závisí na:

- variabilitě sledované veličiny
- počtu sledovaných nezávislých faktorů
- technických možnostech
- požadované míře jistoty
- velikosti očekávaného efektu
- Pozor na příliš velké soubory!



**PRE-TESTY**

# Součásti experimentálního designu I.

- **Cíle** studie – co chci zjistit a jak to chci zjistit
- Stanovení nulové **hypotézy** a alternativní /výzkumné/ hypotézy
- Jaký pokusný zásah, jaké **faktory** /**nezávislé proměnné**/, jejichž účinky na experimentální jednotky budou sledovány
- Jaké **sledované parametry** /**závislé proměnné**/, jejichž odpověď na různou úroveň testovaných faktorů budeme sledovat **v jakých časech**
- Přesné **podmínky expozice**
- Naplánování **počtu opakování** a jejich uspořádání v experimentu

## Součásti experimentálního designu II.

- **KONTROLY** - zařazení všech nezbytných **kontrol** /pre-test/
- Úroveň studovaného pokusného zásahu – všech faktorů
- Expozice čistou chemickou látkou : koncentrace v zásobních roztocích a pak finální koncentrace v expozici /molární konc./
- nutno znát rozpustnost ve vodě, nesmí být v testu překročena
- Standard /pozitivní kontrola/ - zahrnutí vhodných hodnot standardu
- **Časový design experimentu** – na více časových intervalech v závislosti na charakteru odpovědi, případně optimalizovat dobu expozice

# Součásti experimentálního designu III.

- Pokud není hodnocení provedeno přímo po ukončení expozice, určit jak připravit a uchovávat vzorky před analýzou, jak jsou vzorky/standardy/reagenty při daném uchovávání stabilní
- Optimalizovaná metodika měření sledovaných parametrů v odpovědi na expozici /optimalizace předem/
  - koncentrací reagentů
  - množství vzorku
  - doby a teploty inkubace
  - podmínek měření apod.
- Vícefaktorové uspořádání: vliv koncentrace za různých světelných či tepelných podmínek při různých dobách expozice
- Jak budou získaná data hodnocena



# Nezbytnost a výhody experimentálního designu

- důkladné promyšlení a naplánování experimentu
- snadná návaznost dalších experimentů – přesně popsány všechny podmínky – pro navazující experimenty netřeba přepisovat, jen překopírovat, doplnit a zvýraznit změny
- přehlednost, snadné dohledání důležitých informací
- výborně využitelné i po delší době pro psaní publikací a pod.
- snadné doplňování, zapisování změn – k designu je nutné doplnit krátký report o průběhu experimentu, pokud něco významného oproti designu – např. velká změna pH nebo teploty apod.
- odkazem možno propojit design na soubor s výsledky



# Důležité otázky při každém hodnocení dat:

- Jak dobře je studie provedena?
- Jsou aplikovány a dodrženy standardní metodiky?
- Je použitý test vhodný?
- Jsou výsledné parametry stanoveny za relevantních podmínek?
- Je interpretace dat správná?



*Data don't make any sense, we will have to resort to statistics.*

Hodnocení (eko)toxikologických účinků

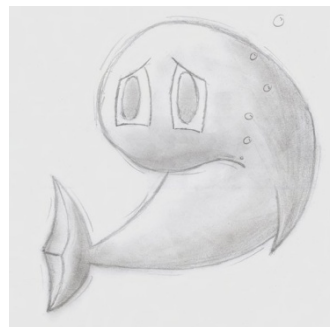
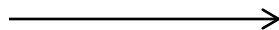
## VZTAH DÁVKA-ODPOVĚĎ

### Křivka dávka – odpověď:

základní nástroj pro hodnocení toxických vlastností látek

Graf ukazující biologickou odpověď, např. enzymu, proteinu, či organismů na rozmezí dávek (koncentrací) toxické látky

Např.: Křivka mortality - závislost kumulativní mortality na vzrůstající koncentraci



# VZTAH DÁVKA - ODPOVĚD

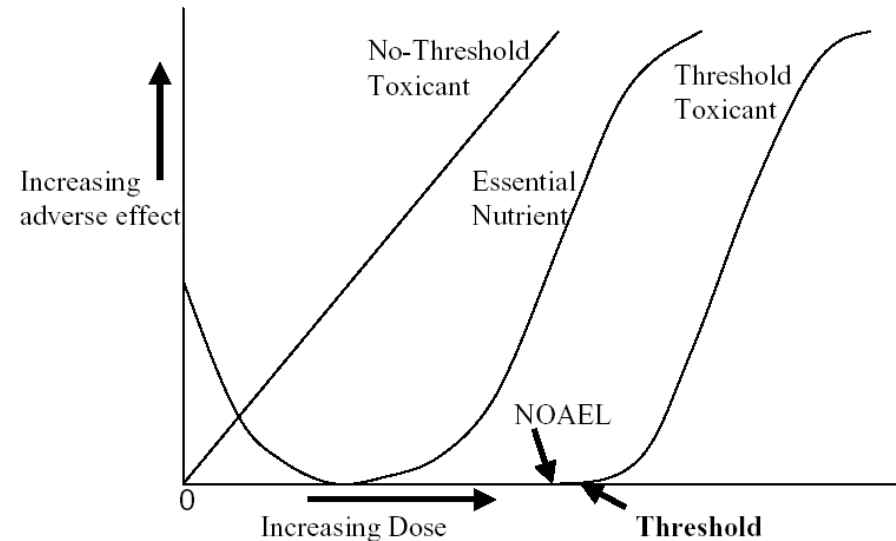
„Všechny látky jsou jedy, záleží pouze na dávce. Správná dávka odlišuje jed od léčiva.“

*Paracelsus*

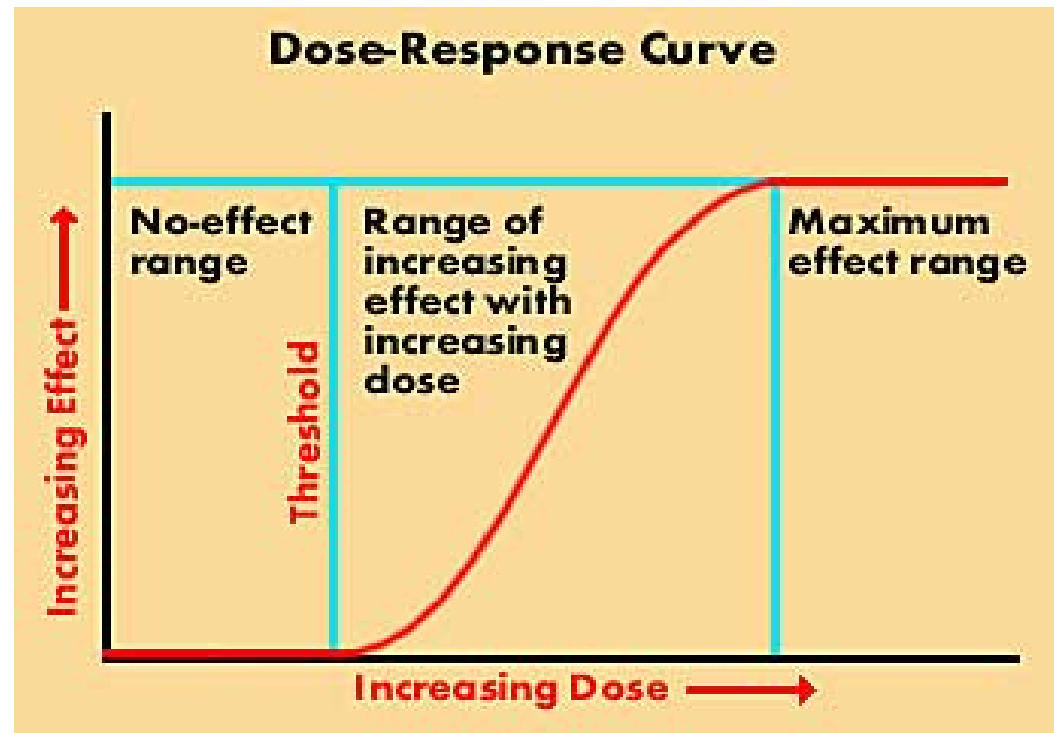
Toxicita látky nezávisí pouze na toxických vlastnostech látky, ale hlavně na její koncentraci/dávce.

## Odpověď na stres

- Prahová – žádná biologická odpověď při nízké dávce, pak se odpověď projeví se vzrůstající dávkou
- Bezprahová – bez biologické odpovědi pouze na nulové koncentraci
- Hormeze – počáteční biologická odpověď na toxikant je pozitivní, při vzrůstu koncentrace se stává negativní, nebo naopak



# Odpověď na stres prahová



## **Prahová dávka**

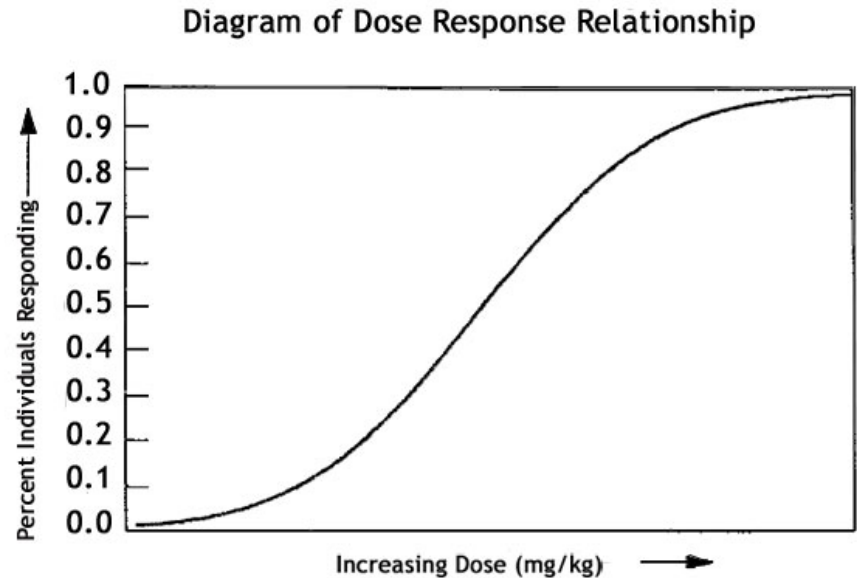
~ dávka, pod níž není možné v exponované populaci detekovat škodlivý účinek toxické látky

(tato dávka platí pro všechny jedince v dané populaci)

~ tzn. dávka pod kterou nedojde k žádnému úmrtí zvířete, k žádným patologickým změnám, k žádným biochemickým změnám ...

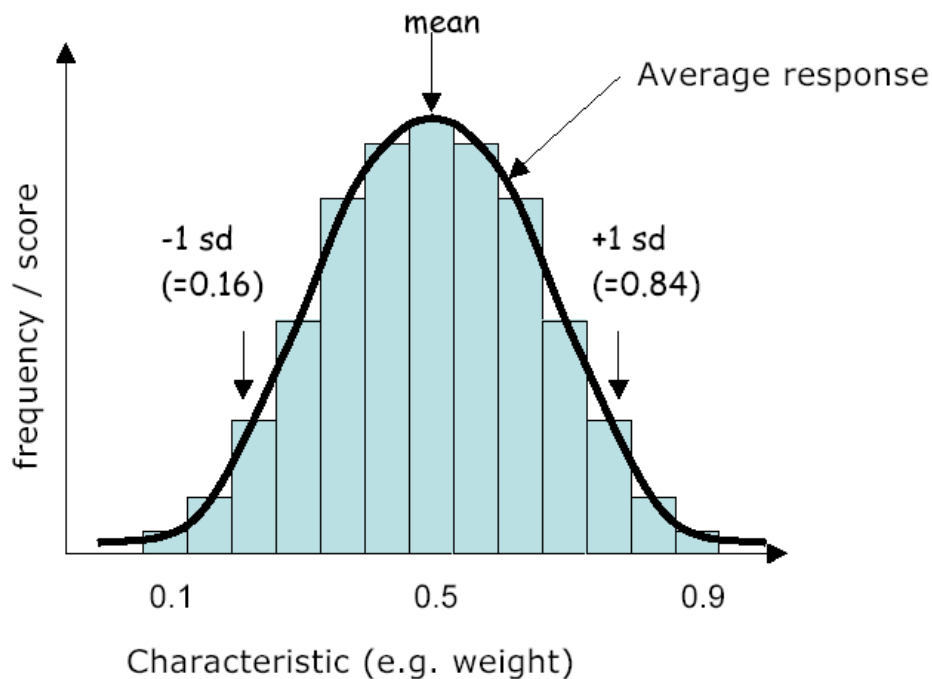
# Křivka dávka-odpověď

- čím vyšší dávka, tím vyšší toxický efekt
- dávka určuje biologickou odpověď
- vztah mezi dávkou a účinkem je logaritmický
- po zlogaritmování - grafickým vyjádřením tohoto vztahu je obecně křivka ve tvaru sigmoidy
- z ní je možno odvodit důležité parametry toxicity

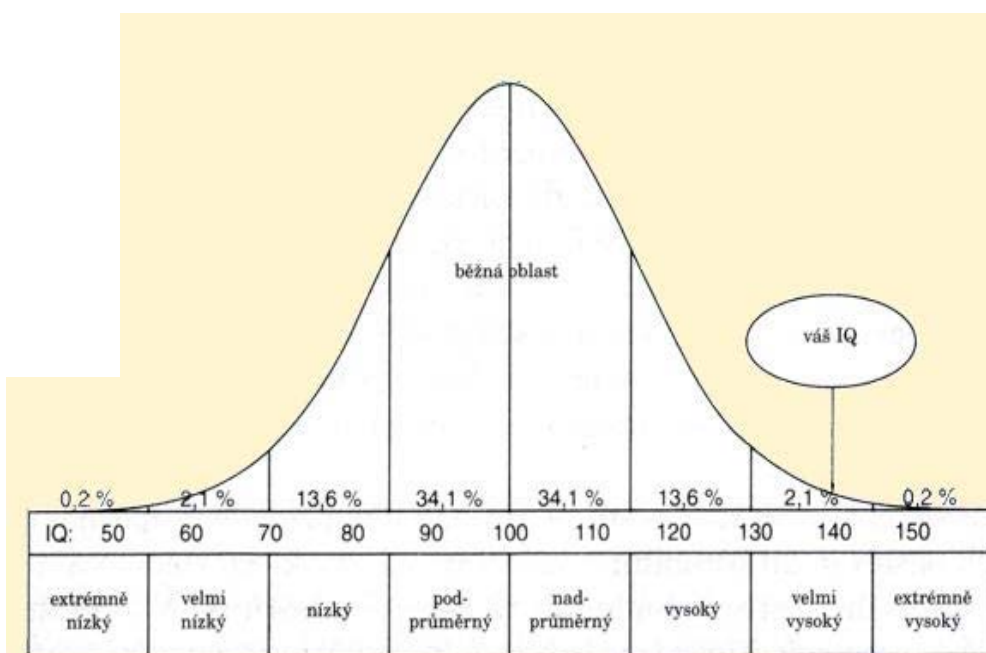


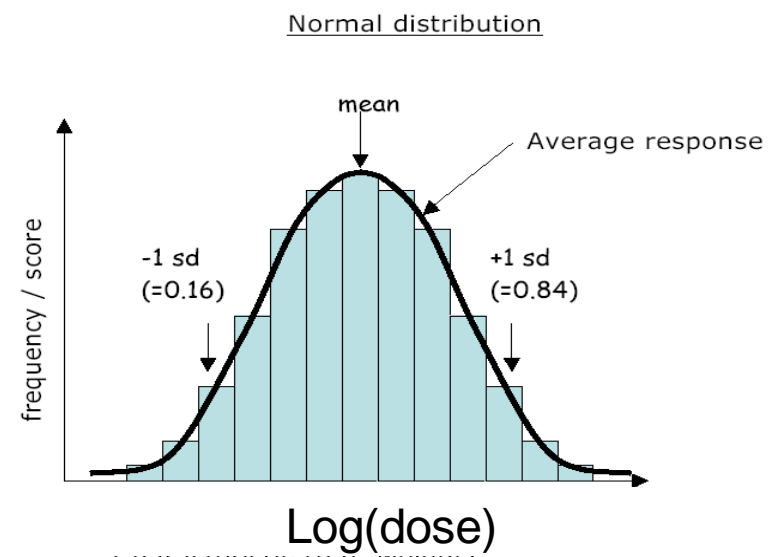
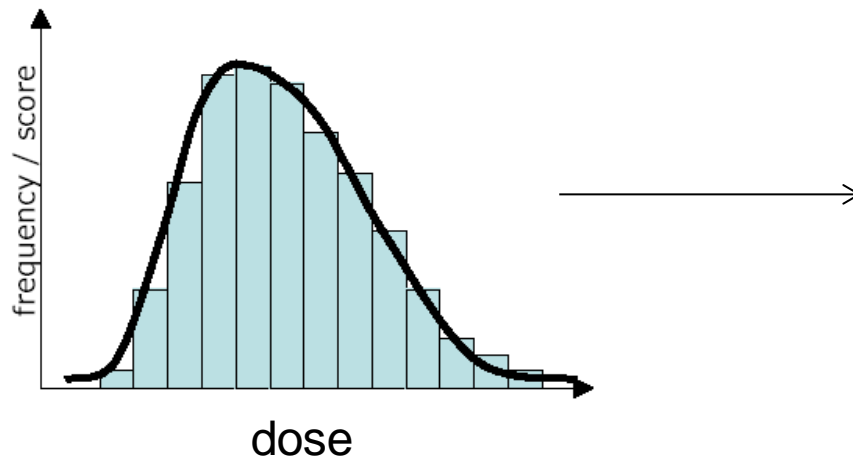
# Křivky dávka-odpověď jsou založeny na normálním (Gaussově) rozložení hodnot

Normal distribution



Příklad – rozložení inteligence ve společnosti



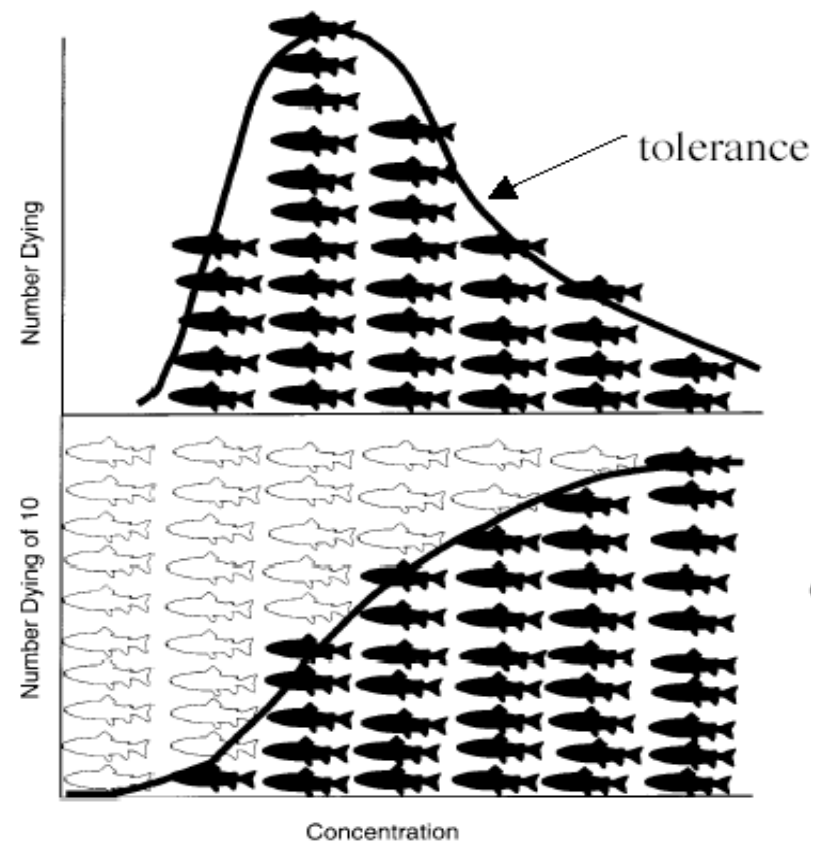


! Populační odpověď na toxické látky je zpravidla skloněná nalevo !

→ Normálnímu rozložení se přiblížíme logaritmickou transformací dávky toxikantu

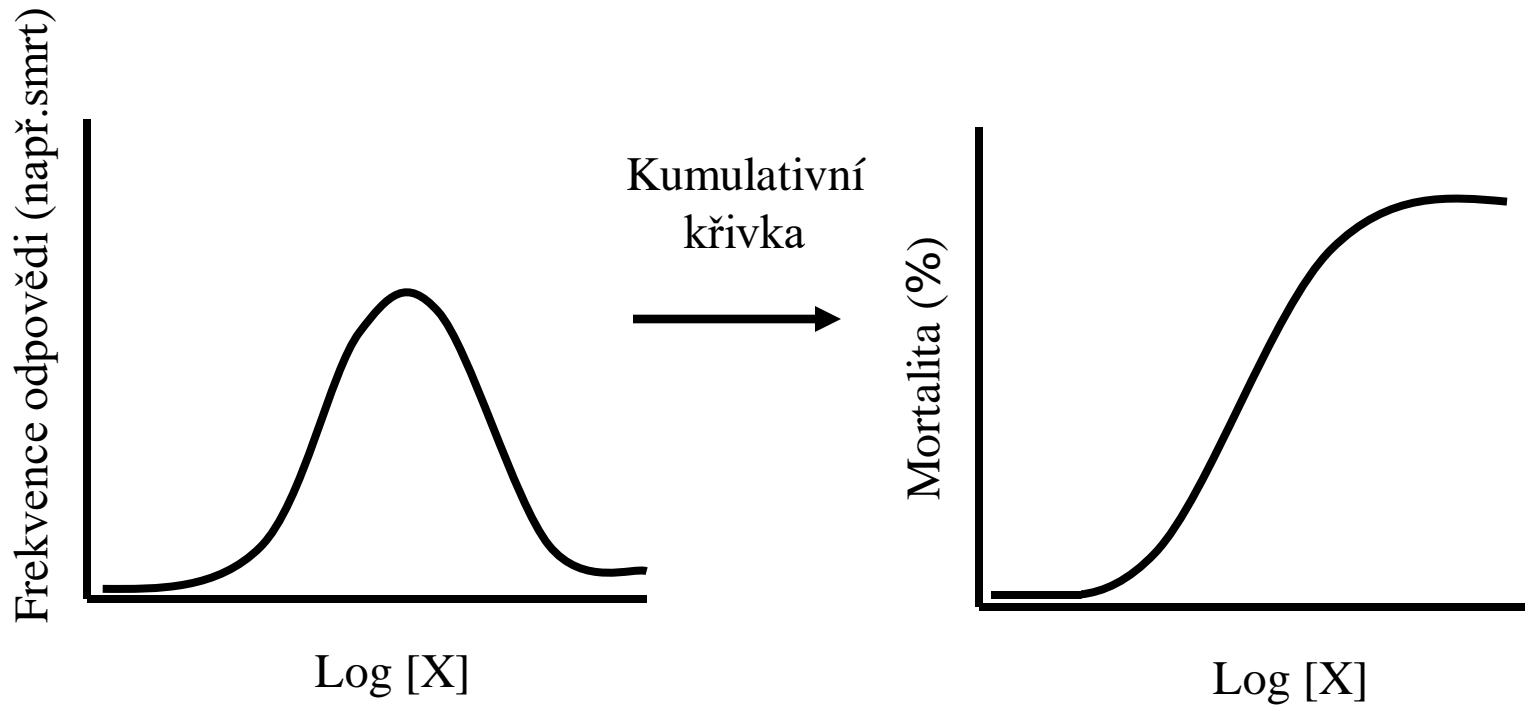
založeno na konceptu individuální tolerance

- ~ individuální účinná dávka (IED) – minimální dávka vedoucí ke smrti jedince
- ~ geneticky určená pro každého jedince



Křivky dávka-odpověď jsou založeny na normálním (Gaussově) rozložení hodnot

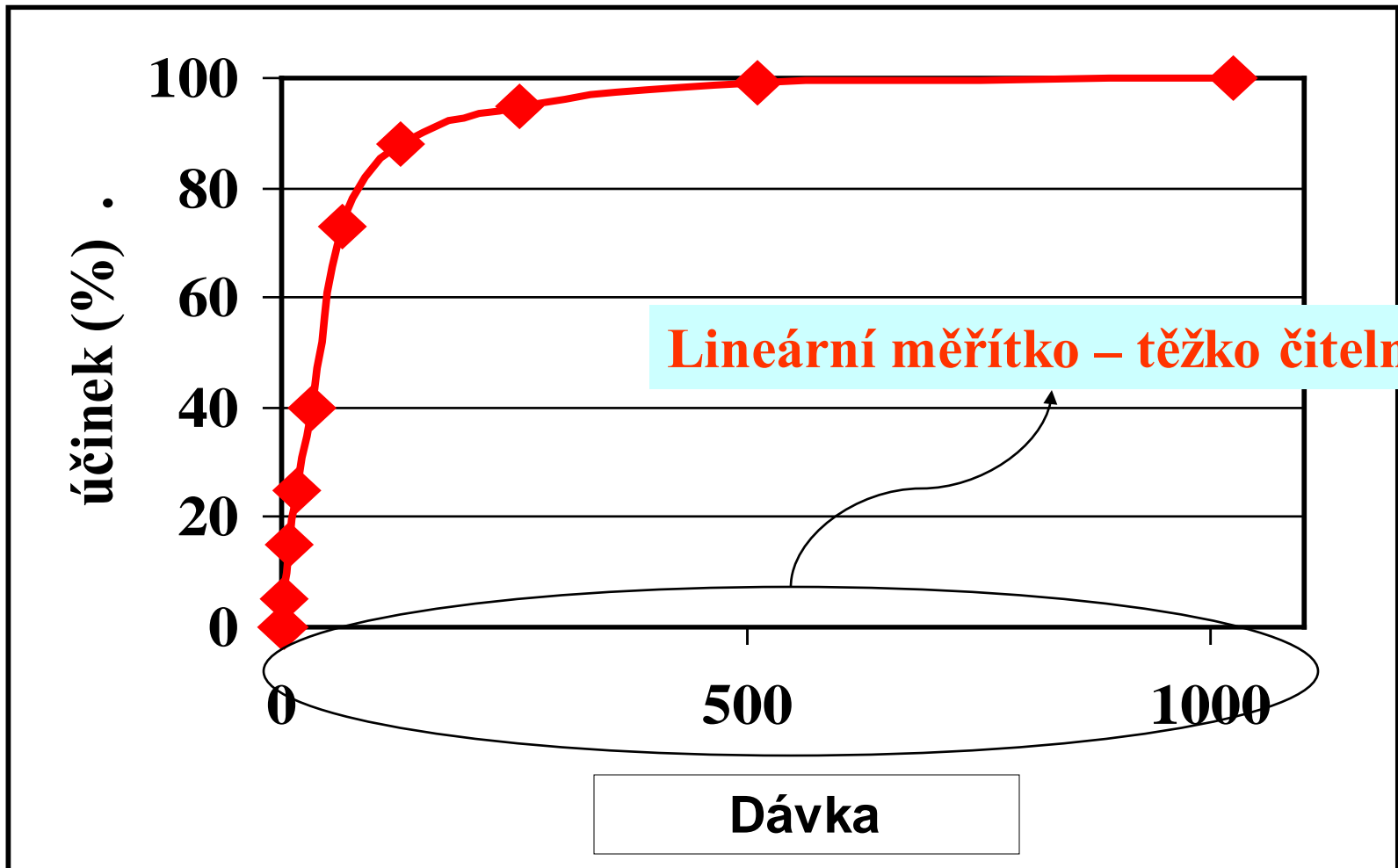
Získ typické křivky dávka – odpověď pro prahový účinek:





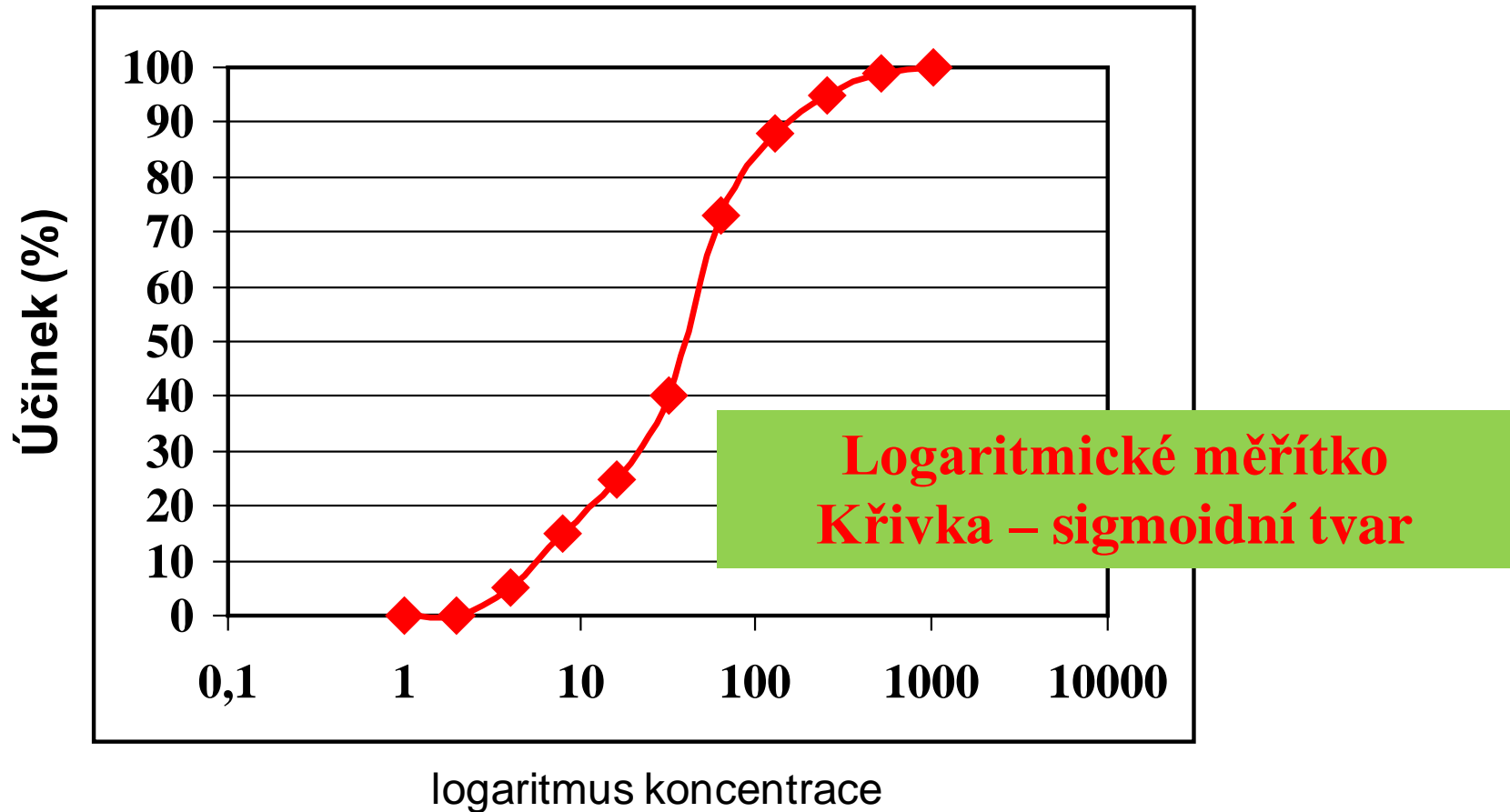
# Prahová odpověď - Ideální křivka dávka – odpověď:

~ naměřené efekty pokrývají celou škálu účinků od minimálních po maximální možné

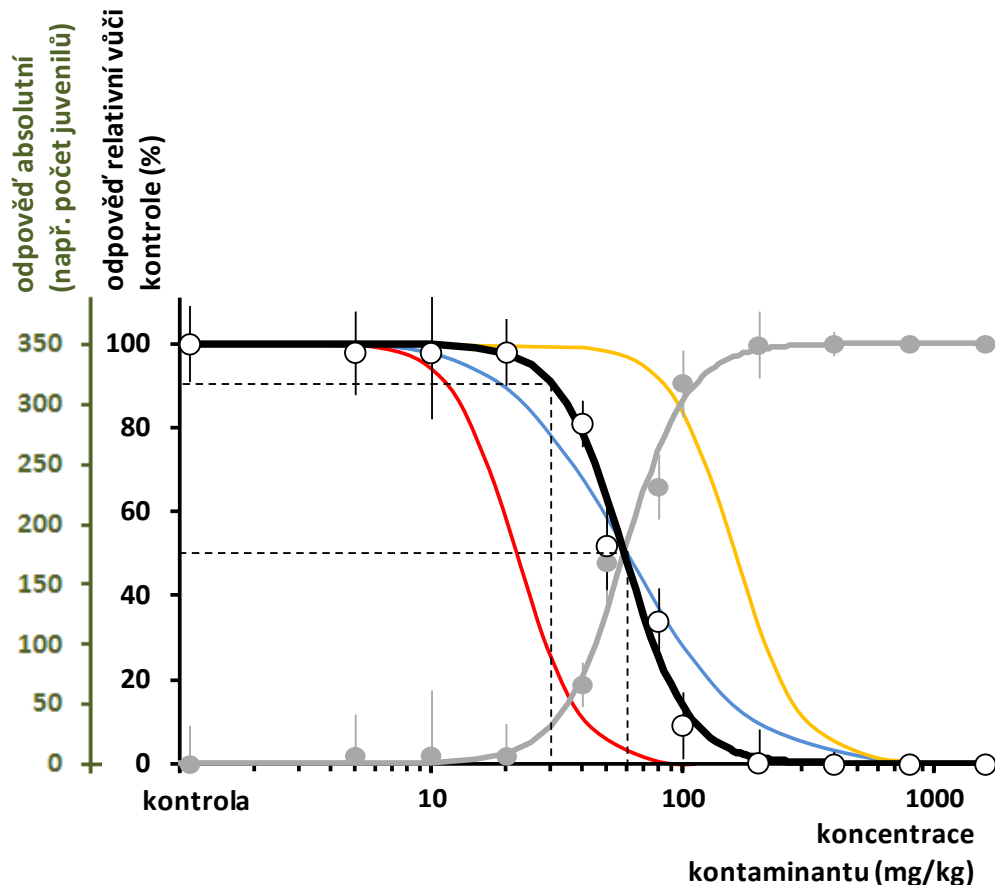


## Ideální křivka dávka – odpověď:

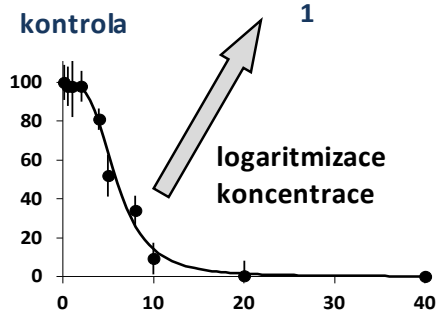
~ naměřené efekty pokrývají celou škálu účinků od minimálních po maximální možné



# Vztah koncentrace - účinek



- osa X - koncentrace testovaného kontaminantu či ředění testovaného materiálu (případně intenzita stresoru)
  - většinou v logaritmické škále - rozložení reaktivnosti bioty na zvyšující se stres má většinou log-normální charakter a logaritmováním osy X dostává křivka lépe modelovatelný středově souměrný sigmoidní tvar
  - kontrola odpovídá nulové koncentraci (nepřítomnosti sledovaného faktoru) - na počátku osy



# Vztah koncentrace – účinek osa X

- DÁVKA vs KONCENTRACE
  - Toxikologie – Dávka - mg/kg b.w. - body weight, mg/kg b.w./day
  - Ekotoxikologie – spíše se pracuje s koncentracemi – mg/L, mg/kg<sub>soil</sub> apod.

## Concentration and Dose

Concentration and dose both refer to the amount of test material to which the test organism is subjected. Concentrations are used to describe the amount of test material in the testing environment (e.g., mg/L in water, mg/kg in soil or mg/kg in food). Doses are used to describe the amount of test material administered to a subject (e.g., mg/kg-bodyweight in an avian bolus study). Statistical methods for both types of studies are identical; however, interpretations are different. Although "concentration" is used throughout this document, all the statistical methods presented here also apply to studies in which a dose is used.

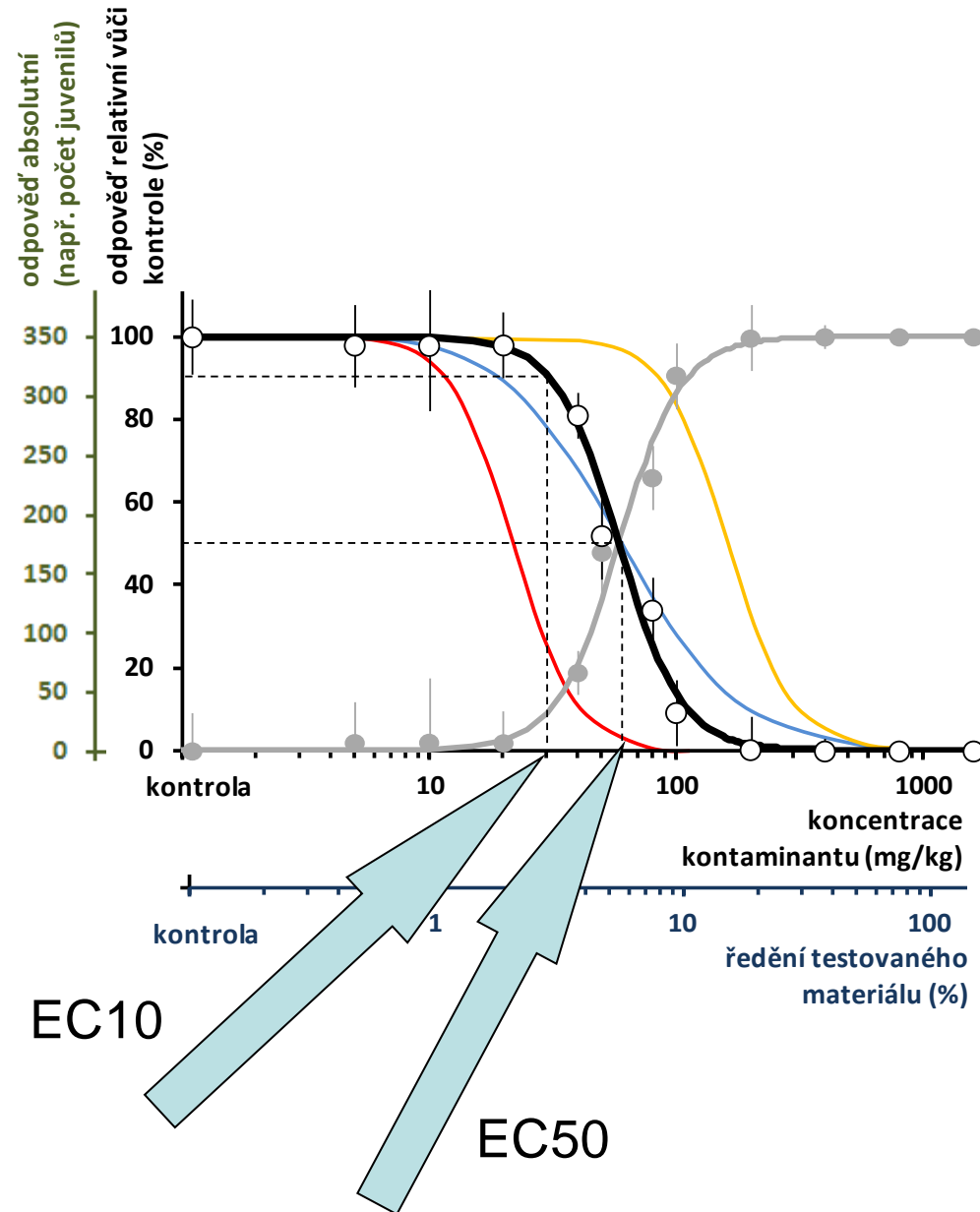
- čisté látky a definované směsi látek
  - koncentrace v médiu - mg/L, mmol/L (= mM), mg/kg apod.
- vzorky z prostředí
  - extrakty ze vzorků a jejich % ředění
  - % zastoupení vzorku v referenčním materiálu

# Vztah koncentrace – účinek osa Y

- vyjádření a zpracování výsledku – sledovaného parametru - sledovaná odpověď, např.
  - počty (organismů) s pozorovanou definovanou odpovědí (binární data)
  - frakce (procenta) exponovaných organismů, u kterých byla pozorována odpověď
  - v původních jednotkách parametru (např. počet přežívajících jedinců, počet juvenilů, váha, aktivita enzymu), přímo zjištěné výsledky sledovaného parametru
  - v relativní škále vztažením vůči výsledkům v kontrole (většinou v procentech 0 – 100 %) - počet organismů s pozorovaným účinkem
  - relativní (procenta) výsledky sledovaného parametru ve srovnání s kontrolou, která představuje 100 % (normální stav, vůči kterému dochází ke snižování vlivem eko-toxicity k 0 %, což je maximální ekotoxicita)
  - inhibice – míra poklesu sledovaného parametru vůči kontrole (kontrola představuje 0 %, v kontrole je nulová inhibice, 100 % je maximální ekotoxicita)

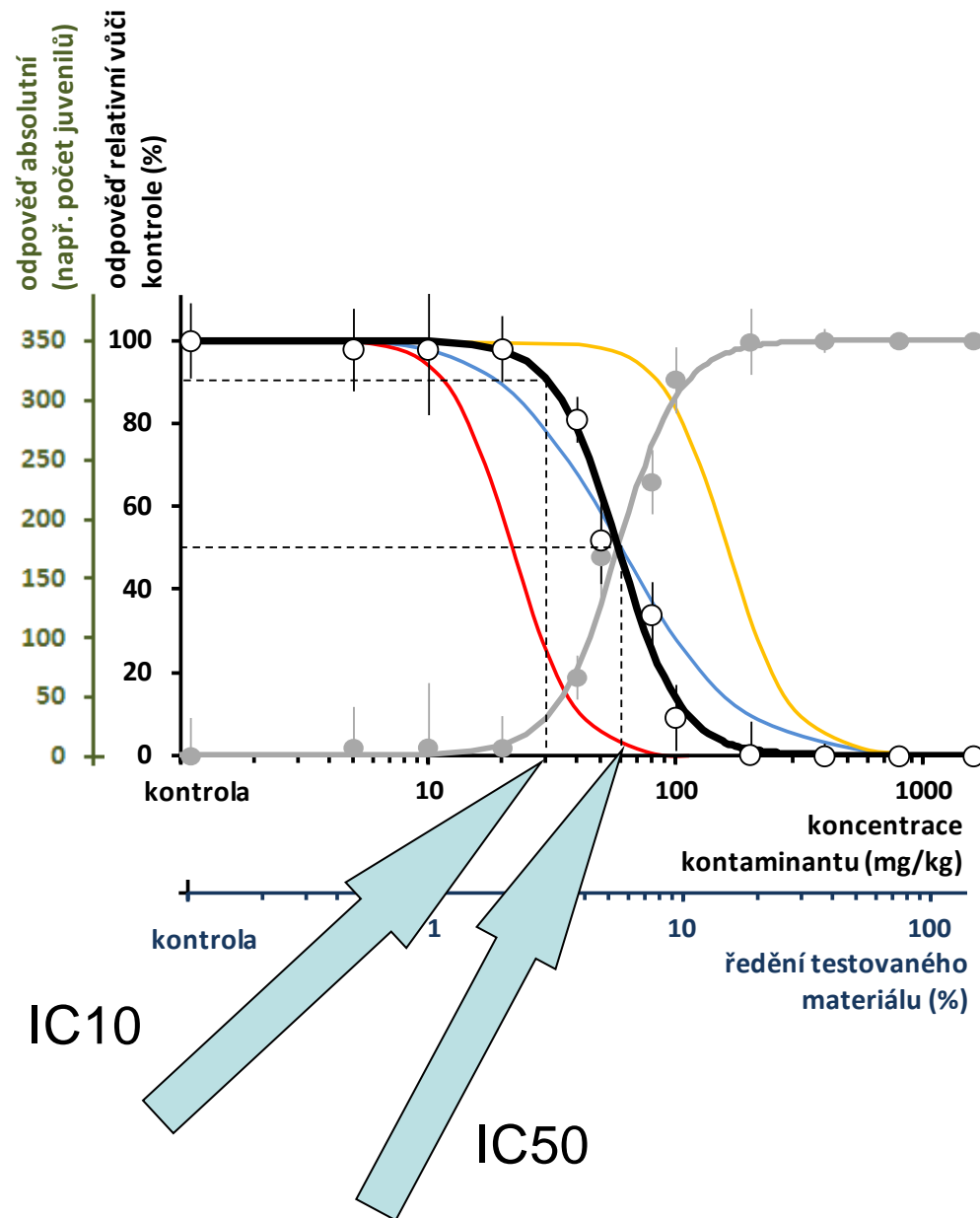
# Vztah koncentrace - účinek

- nejlépe vztah popisuje celá křivka - nejkorektnější srovnání eko-toxicity různých látek (vzorků)
- pokud není prezentována celá křivka - používají se pro charakterizaci **parametry eko-toxicity** :
- **EC<sub>x</sub>** („effective concentration“)
  - efektivní koncentrace
  - jde-li o kvantitativní sledovaný parametr (např. počet juvenilů/potomků, váha, aktivita, velikost...), je to koncentrace, v níž se změnil sledovaný parametr o X % ve srovnání s kontrolou
  - jde-li o kvalitativní sledovaný parametr (např. má/nemá léze), je to koncentrace, v níž je sledovaný účinek pozorován u X % organismů



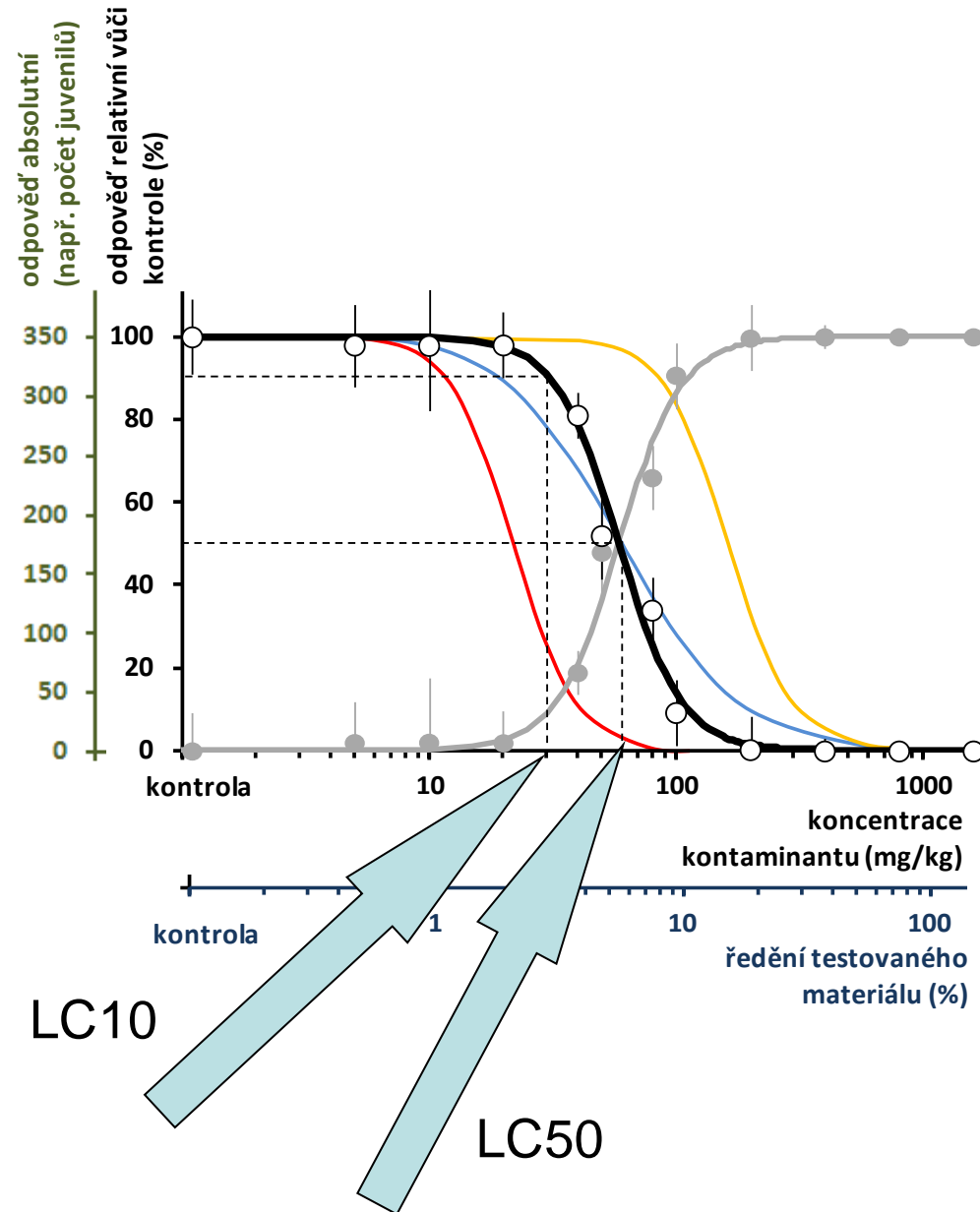
# Vztah koncentrace - účinek

- parametry eko-toxicity :
- $IC_x$  („inhibition concentration“)
- inhibiční koncentrace
- koncentrace, v níž dosahuje sledovaný parametr X % inhibice oproti kontrole (např. počet juvenilů, váha, aktivita, velikost...)



# Vztah koncentrace - účinek

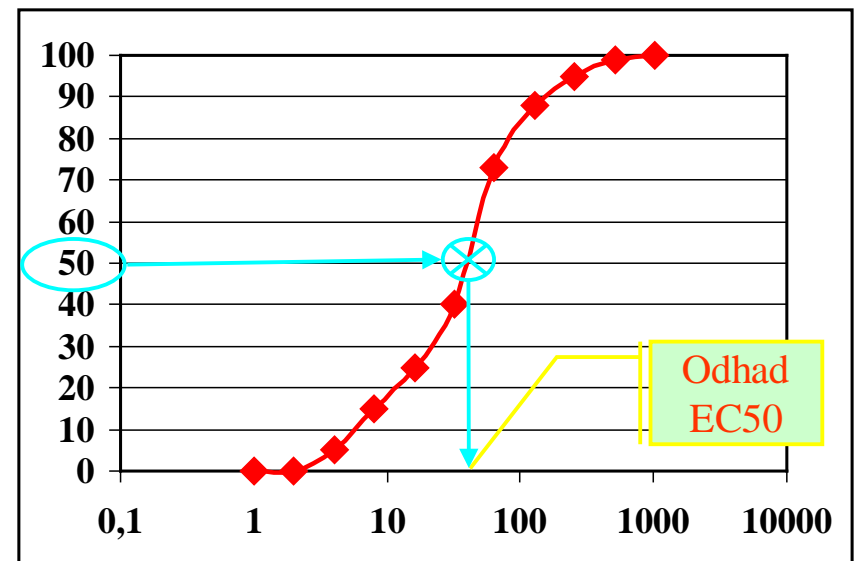
- parametry eko-toxicity :
- $LC_x$  („lethal concentration“)
- letální koncentrace
- koncentrace, v níž došlo k letalitě (mortalitě) X %, tj. uhynulo X % z exponovaných organismů
- pokud je zaznamenána nějaká mortalita v kontrole, může jít o koncentraci, v níž uhynulo X % organismů ve srovnání s kontrolou



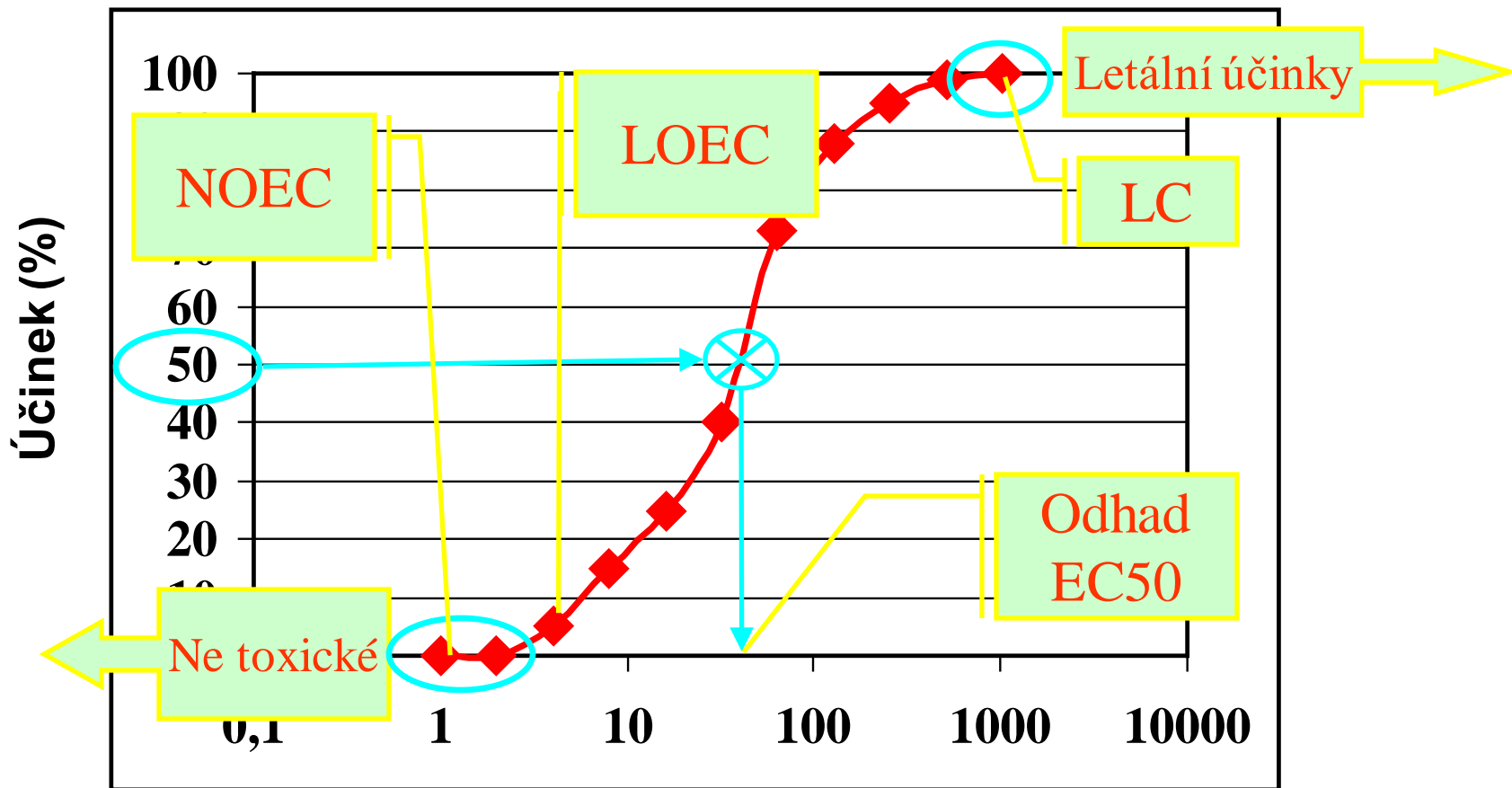


# Parametry které mohou být vypočítány z křivky dávka-odpověď

- **LD<sub>50</sub>** – účinná dávka, která způsobí 50% mortalitu testovacích organismů
- **LC<sub>50</sub>** – 50% letální koncentrace - účinná koncentrace, která způsobí 50% mortalitu testovacích organismů
- **EC<sub>50</sub>, ED<sub>50</sub>** - účinná koncentrace/dávka, která způsobí účinek (snížená reprodukce, růst atd.) u 50% testovacích organismů, či která způsobí 50 % maximálního účinku, 50% odpověď v testovací populaci (mg/L, ml/L...)
- **IC<sub>50</sub>** – inhibiční koncentrace, která sníží normální odpověď o 50%
- Další zahrnující jinou procentuální změnu (10%, 20%, atd.)  
EC05, EC20, EC90, ...
- Rozmezí EC20 – EC80



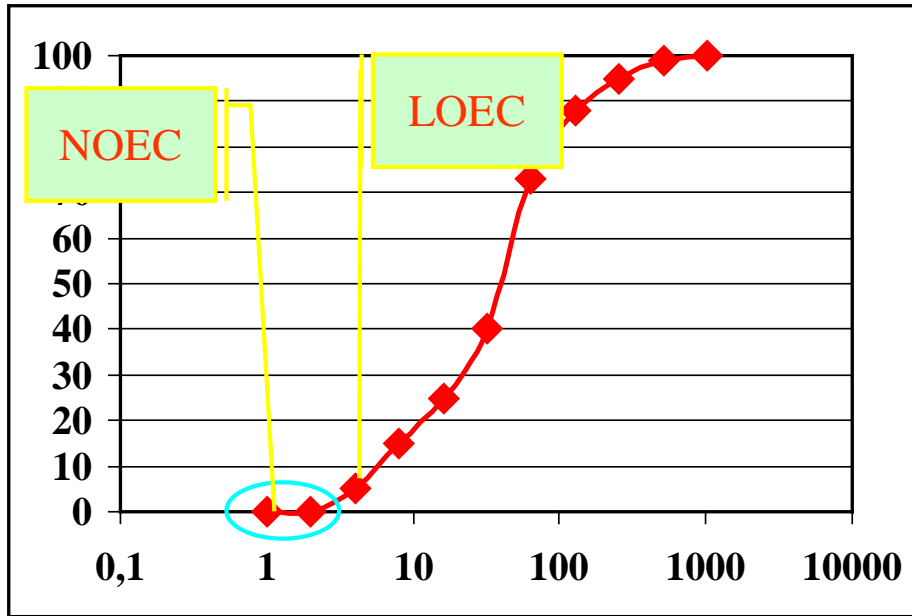
# Ideální křivka dávka – odpověď



logaritmus koncentrace

**Logaritmické měřítko**  
**Křivka – sigmoidní tvar**

# Parametry které se odvozují z oblasti nízkých dávek/koncentrací



- **NOEC** - No Observed Effect Concentration. Nejvyšší testovaná koncentrace látky, která nezpůsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou.
- **LOEC** - Lowest Observed Effect Concentration. Nejnižší testovaná koncentrace látky, která způsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou. Nejbližší vyšší koncentrace než NOEC.

- **NOEL** - No Observed Effect Level. Nejvyšší testovaná dávka látky, která nezpůsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou.
- **LOEL** - Lowest Observed Effect Level. Nejnižší testovaná dávka látky, která způsobila statisticky významný účinek v porovnání s kontrolou.
- **NOAEL** - No Observed Adverse Effect Level. Nejvyšší testovaná dávka látky, která nezpůsobila negativní (škodlivý) účinek. Je pozorován účinek, ale není považován za nebezpečný.
- **LOAEL** - Lowest Observed Adverse Effect Level. Nejnižší testovaná dávka látky, která způsobila škodlivý účinek.

# Sledované parametry testů toxicity

## krátkodobé studie:

- LC50/LD50 (letální koncentrace/dávka pro 50% testovaných organismů)
- EC50/ED50 (účinná koncentrace/dávka pro 50% testovaných organismů)

## dlouhodobé studie :

- NOEC, NOEL, NOAEL (no observed effect concentration/dose)
- LOEC, LOEL, LOAEL (lowest observed effect concentration/dose)

## další možné :

- EC10 (10 % effects concentration)
- ECx ( x % effects concentration)

# 3

## Experimentální design pro testy toxicity (látky s prahovým účinkem)



# Experimentální design: Správné testování toxicity

## Krok 1 – Limitní test

- test velmi vysoké dávky, která v reálné situaci nenastane
- zpravidla výchozí dávka 2000 mg/kg.
- a) negativní výsledek – test ukončen
- b) Úhyn/významný účinek - podrobnější studie na více dávkách

## Krok 2 – Skrínigový test

Provádí se, pokud nemáme podkladová data  
(pro úsporu materiálu při hledání lineární části odpovědi)

- Exponovat skupiny několik organismů desítkové koncentrační řadě
- Cílem určit rozmezí kde se nachází 50 % efektivní/letální koncentrace (EC50/LC50)

# mrtvých	žádný	žádný	několik	všichni	všichni
	0	0	30%	100%	100%
Koncen.	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$10^{-1}$	$10^0$	$10^1$

## Krok 2 – Definitivní test

- Z předchozích výsledků – stanovit rozmezí testu:

→ dolní =  $10^{-2} = 0.01$  mg/L

→ horní =  $10^0 = 1.0$  mg/L

- Použít více (až 10-30) organismů → náhodně rozdělit mezi testovacími skupinami
- Provést test s využitím logaritmického měřítka koncentrací, protože organismy zpravidla odpovídají logaritmicky na toxikanty
  - Obvykle použít alespoň 5 koncentrací + kontrola

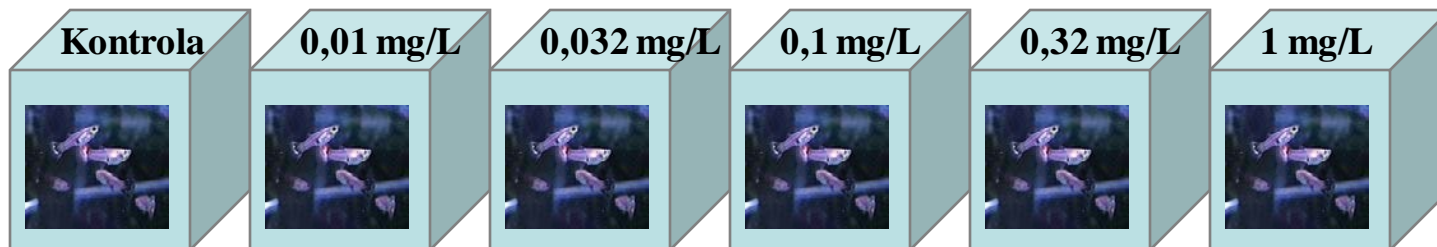
Kontrola – ověřuje toxicitu pozadí, ředící vody, media, zdravotní stav organismů, vliv stresu testovacího prostředí (testovací nádoby, osvětlení, teplota, atd.)

!!Validita testu!! např. úhyn >10% kontrolních organismů → neplatný test!

# Příklad uspořádání definitivního testu

Pokus. zásah	Ředění	Koncentrace (mg/L)
1	$10^{-2}$	0.01
2	$10^{-1.5}$	0.032
3	$10^{-1}$	0.1
4	$10^{-0.5}$	0.32
5	$10^0$	1.0
Kontrola		0.0

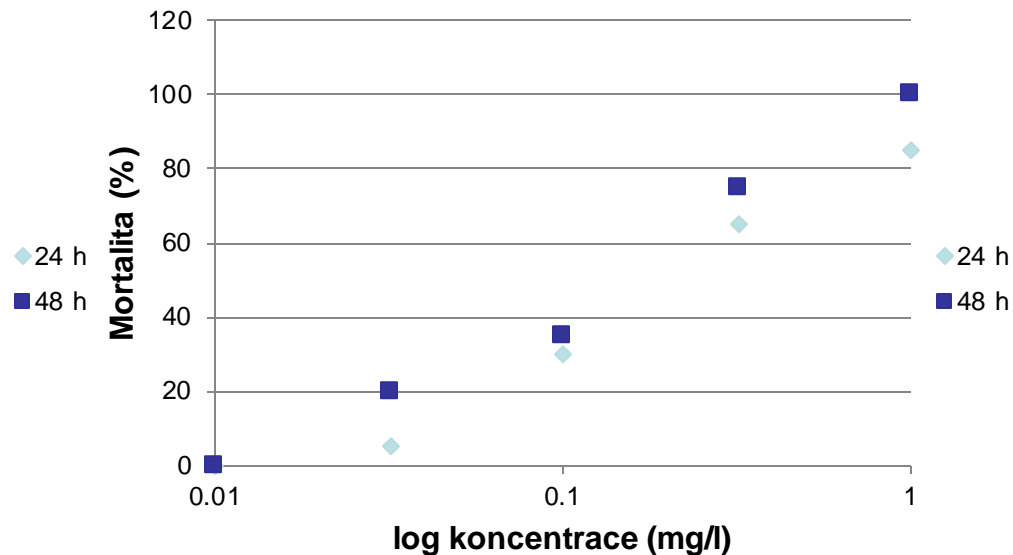
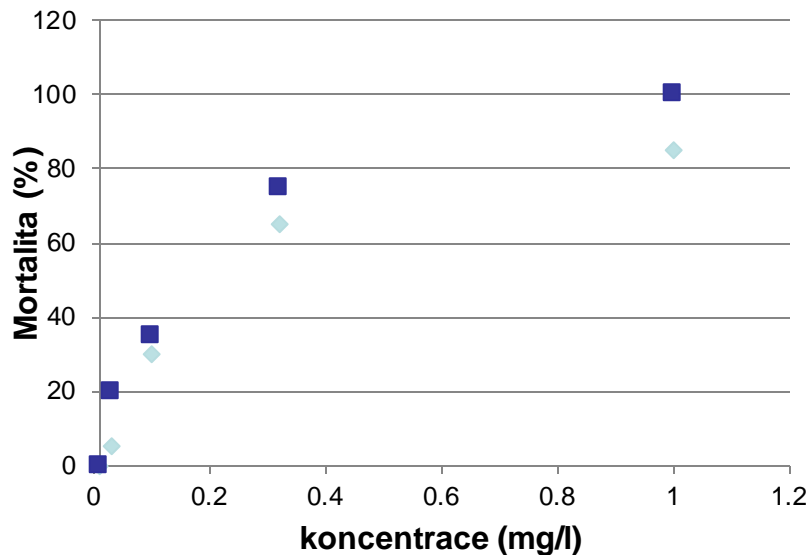




Exponováno 20 jedinců/koncentraci					
Odpověď po 24 hodinách, jedinců					
0	0	1	6	13	17
Odpověď po 96 hodinách, jedinců					
0	0	4	9	15	20

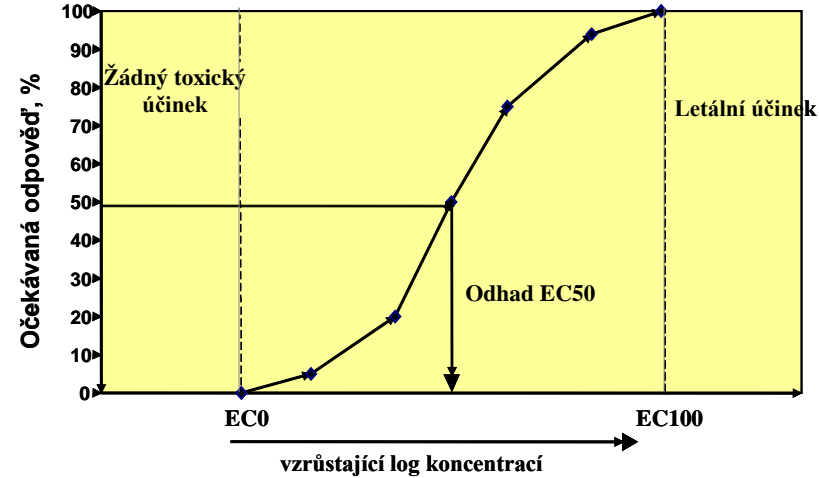
# Výsledek testu

Koncentrace	Kontrola	0.01 mg/L	0.032 mg/L	0.1 mg/L	0.32 mg/L	1 mg/L
Účinek 24 h	0%	0%	5%	30%	65%	85%
Účinek 96 h	0%	0%	20%	35%	75%	100%



# Testované koncentrace

!Kvalita výsledků je určena správným výběrem testovaných koncentrací!

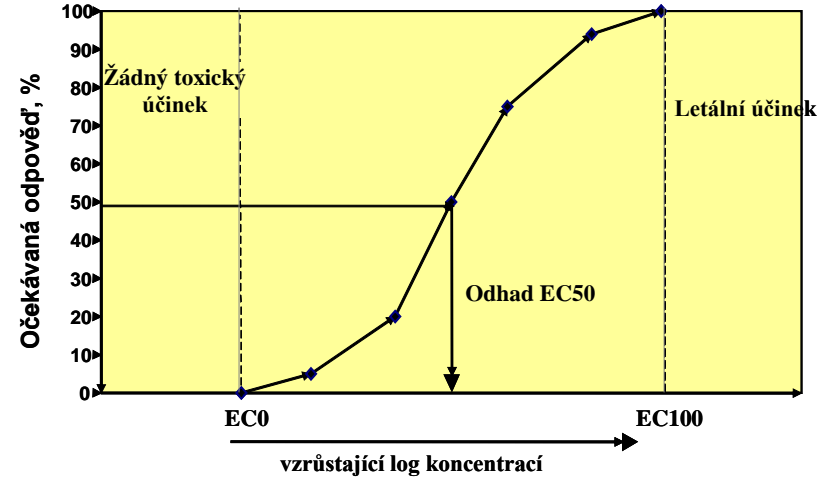


a) Koncentrační řada pro stanovení EC50/LC50:

- Testované koncentrace by měly pokrývat rozmezí od koncentrací nevykazujících žádný účinek až po 100% letální koncentraci
- Dobře vybraná koncentrační řada pro stanovení EC50/LC50 má jednu koncentraci blízko EC50, a nejméně dvě koncentrace s částečným účinkem pod a nad EC50 – rozložené symetricky.
- Koncentrační řada by měla být v geometrickém měřítku. Ředící krok (koeficient) obvykle 2 až 10
- Příklady koncentračních řad:
  - 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 (látky s mírným sklonem odpovědi (některé pesticidy); koeficient ředění 10)
  - 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 (příkřejší odpověď, koeficient 2)

# Testované koncentrace

!Kvalita výsledků je určena správným výběrem testovaných koncentrací!



b) Koncentrační řada pro stanovení NOEC/LOEC (NOEL/LOEL):

- Dobře vybraná koncentrační řada pro stanovení LOEC/NOEC má několik koncentrací v oblasti nízkých odpovědí, nad a pod očekávanou LOEC a relativně nižší ředící koeficient ( $\leq 2$ )

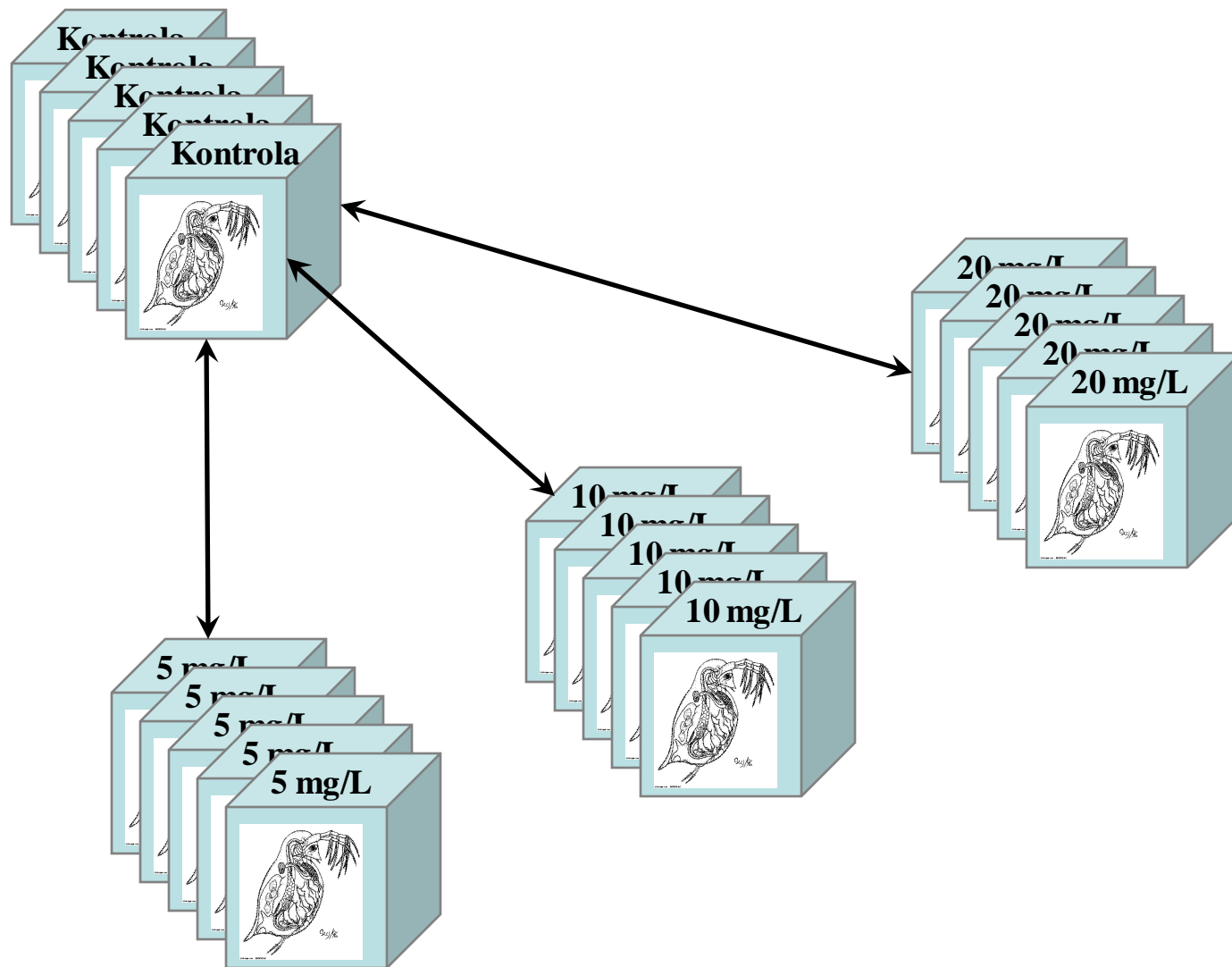
## Stanovení NOEC/LOEC, NOAEL/LOAEL hodnot

- Odpovědi organismů na působení testovaných koncentrací toxické látky jsou porovnávány s kontrolou
- Hledáme nejvyšší koncentraci, která nezpůsobuje toxickou odpověď (NOEC, NOAEL) či první koncentraci, která již způsobí toxickou odpověď (LOEC, LOAEL)

~ využití statistických testů

- ANOVA (Analýza rozptylu) + post-hoc test
  - Kruskal-Wallisův test + post-hoc test

# Stanovení NOEC/LOEC hodnot



# Příklad určení NOEC/LOEC

Porovnááme 3 testované koncentrace s kontrolou



<b>Přežívající dafnie v kontrole</b>	<b>20</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>19</b>
<b>Přežívající dafnie v koncentraci 5 mg/L</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>20</b>	<b>20</b>
<b>Přežívající dafnie v koncentraci 10 mg/L</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>17</b>	<b>19</b>
<b>Přežívající dafnie v koncentraci 20 m/L</b>	<b>18</b>	<b>17</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>16</b>

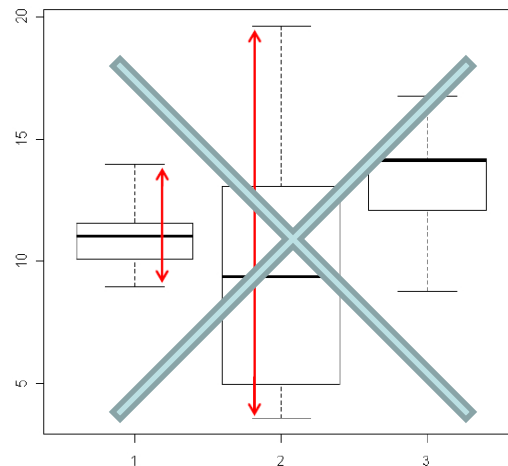
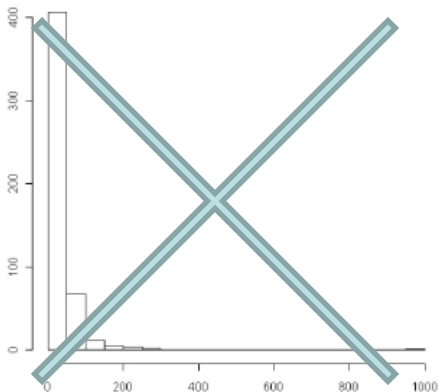
# Stanovení NOEC/LOEC

~ využití statistických testů

- ANOVA (Analýza rozptylu)

! Pro její správné použití je nutné splnit dva předpoklady!

- 1) Hodnoty ve srovnávaných skupinách mají normální (Gaussovo) rozložení (použití testů normality, např. Shapiro-Wilkův test)
- 2) Rozptyly hodnot ve srovnávaných skupinách se od sebe statisticky neliší (použití box-plotů či Levenova testu)

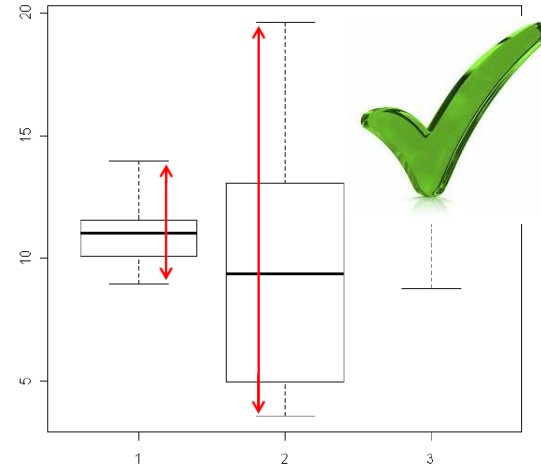
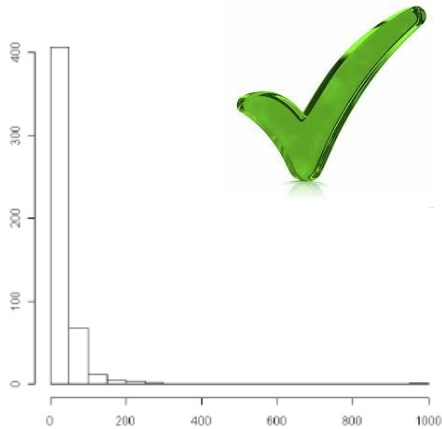




# Stanovení NOEC/LOEC

~ využití statistických testů

- Kruskal-Wallisův test  
~ neparametrická obdoba ANOVA při nesplnění předpokladů



# Stanovení NOEC

~ využití statistických testů

- Následné post-hoc testy

~ pokud ANOVA prokáže významný rozdíl mezi některými z testovaných skupin, použijeme některý z post-hoc testů na nalezení těchto skupin (např. Tukeyho, Dunnettův, Williamsův či LSD test nebo metodu dle Steela a Dwasse v případě použití Kruskal-Wallisova testu)

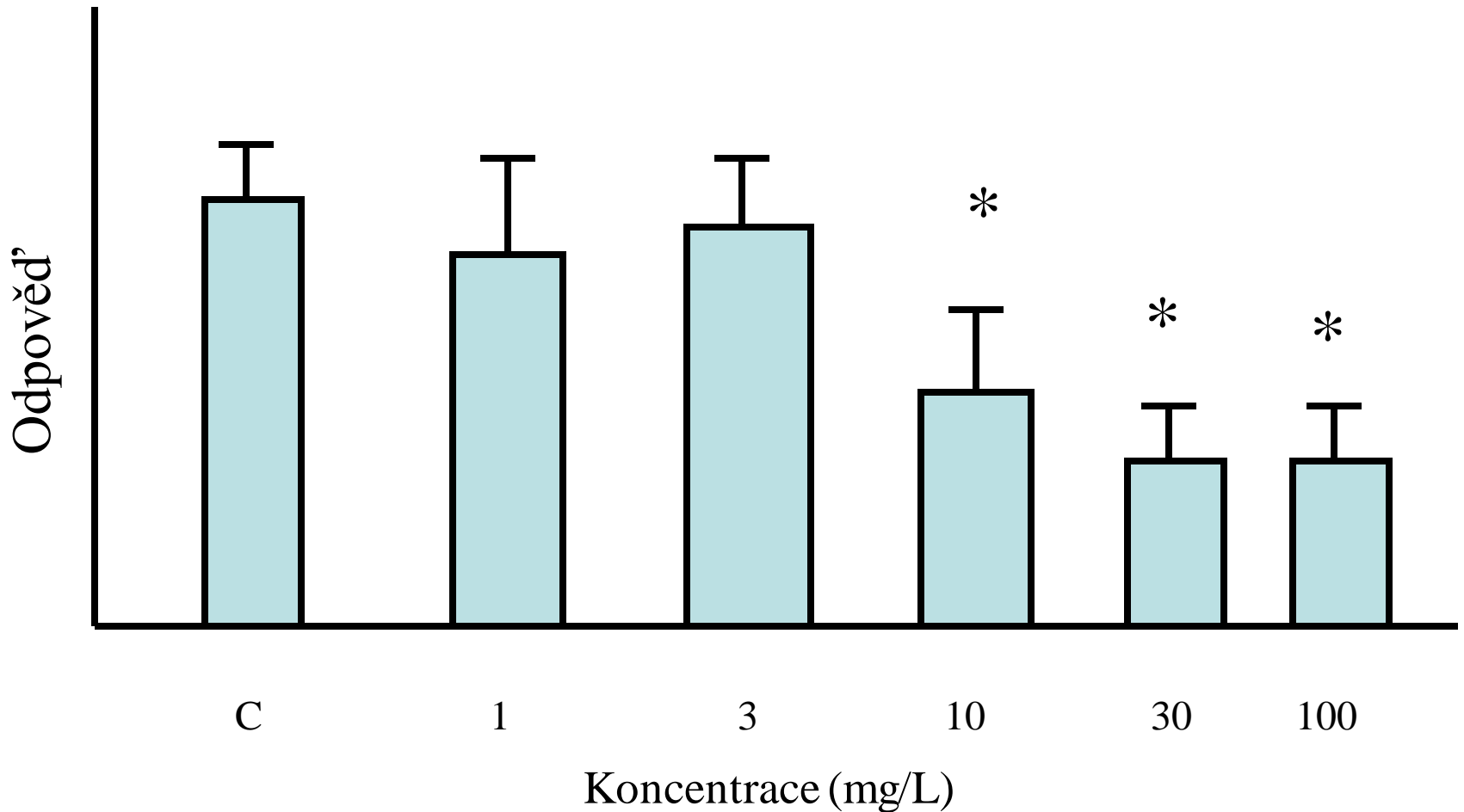
hlubší vhled do statistických metod hodnocení vztahů koncentrace – odpověď:

OECD (2014): Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264085275-en>.

<https://www.oecd.org/env/current-approaches-in-the-statistical-analysis-of-ecotoxicity-data-9789264085275-en.htm>

# Výsledek analýzy rozptylu

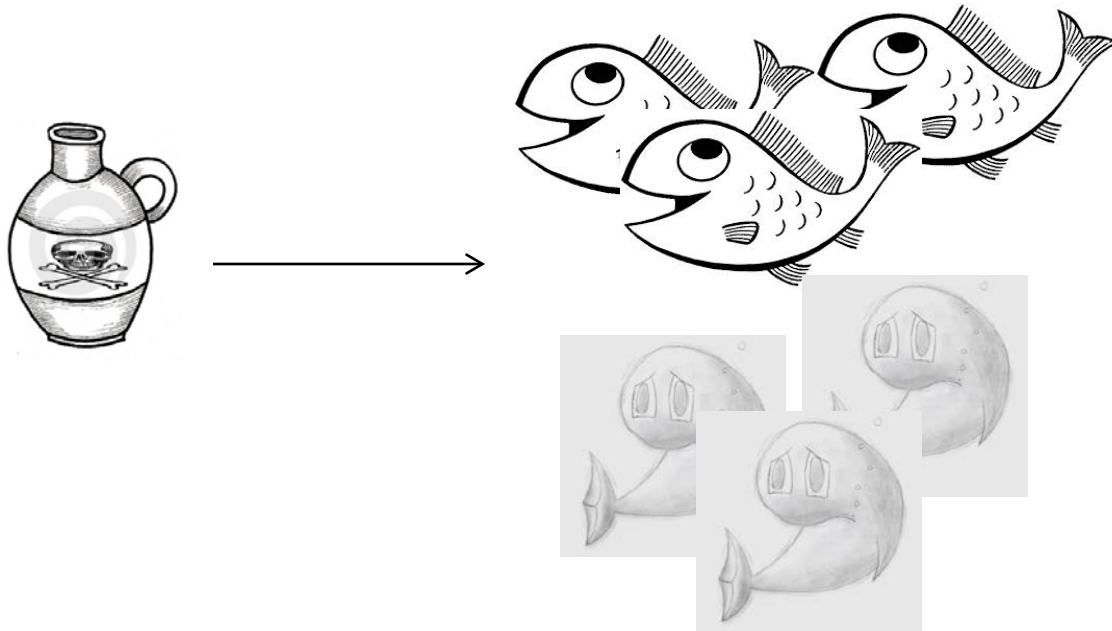
Jaká hodnota odpovídá NOEC?  
A jaká LOEC?



# Nevýhody NOEC/LOEC (NOEL/LOEL) hodnot

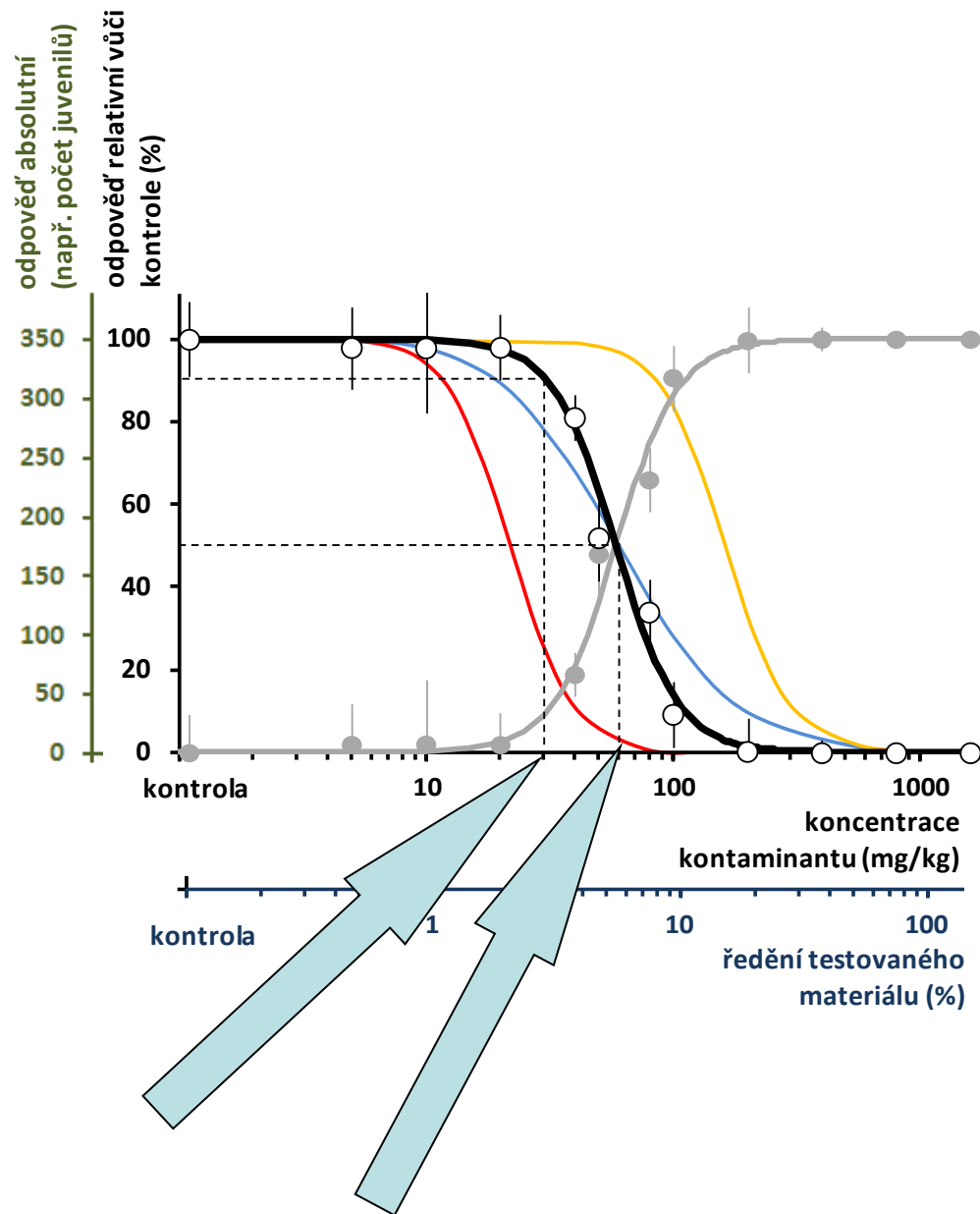
- Jejich hodnota je silně závislá na designu experimentu a na:
  - Počtu opakování
  - Počtu testovaných koncentrací
  - Proceduře výběru koncentrací
  - Přirozené variabilitě systému
  - Použitých statistických metodách
- hodnoty jsou závislé na zvolených koncentracích, kde se testovalo (tj. přímo některé z test. koncentrací) a nemají rozptyl ani interval spolehlivosti

# Stanovení $EC_x/ED_x$ hodnot (látky s prahovým účinkem)



# Vztah koncentrace - účinek

- parametry  $EC_x$ ,  $LC_x$  a  $IC_x$  se vypočítají z proložených regresních modelů případně linearizací probitovou transformací
- z modelu vystupuje výsledek včetně příslušné **nejistoty výpočtu**
- lze definovat **intervaly spolehlivosti** - rozmezí, kde leží daný parametr s definovanou pravděpodobností (např. 95 %) např.  $EC_{50} = 45,2$  (34 - 56) mg/L
- získané parametry mají rozptyl = velká výhoda - lze je (tj. toxicitu) statisticky srovnávat mezi různými kontaminanty
- modelovací přístup = výsledné hodnoty nemusí být v jedné z měřených koncentrací - **významná výhoda  $EC_x$ ,  $LC_x$  a  $IC_x$  přístupu**



# Výpočet EC50

## Interpolační metody

Probitová transformace křivky dávka-odpověď

### **Nelineární regrese**

Pokud je křivka (hlavně její lineární část) detailně proměřená – neměl by být významný rozdíl ve výsledcích získaných různými postupy výpočtu (bohužel ne vždy to je možné)

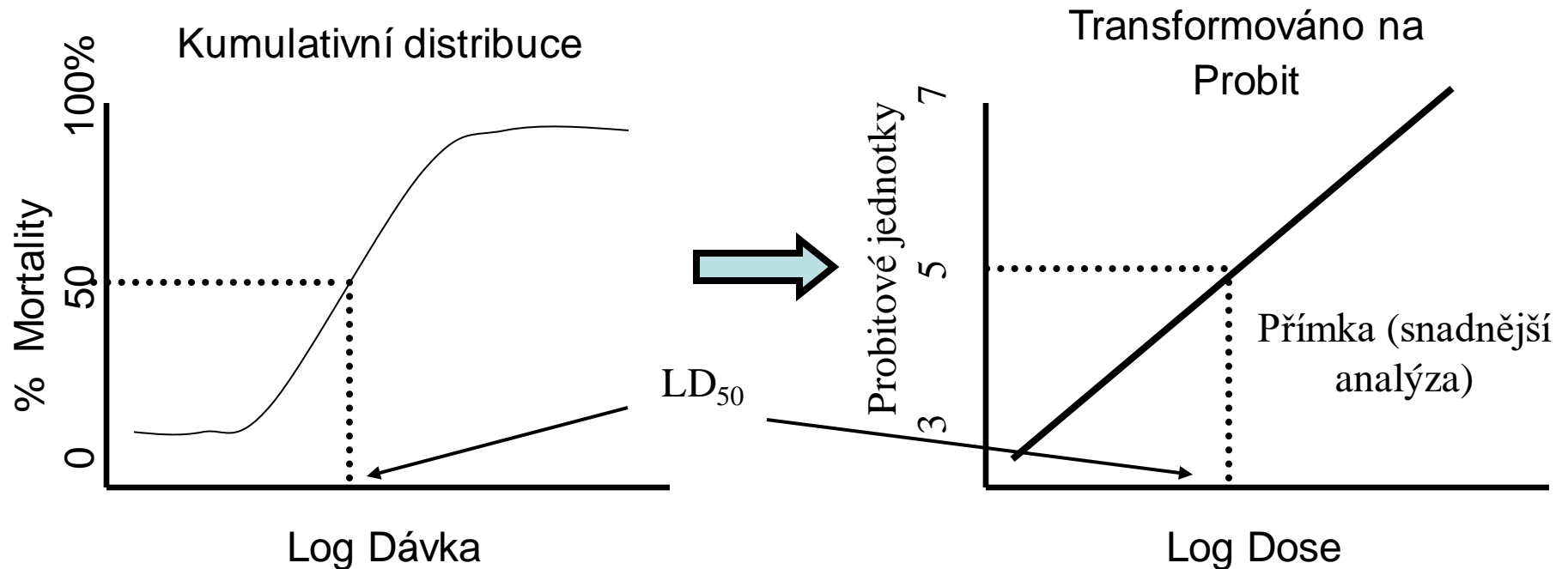
## b) Probitová transformace křivky dávka-odpověď

- Probitová transformace zlinearizuje (narovná) kumulativní distribuční křivku a to lze následně využít pro jednodušší výpočet EC50 (LC50) hodnot
- Založeno na hypotéze že resistance k toxikantům je normálně rozložena
- Výhodou je usnadnění analýzy
- Založeno na směrodatných odchylkách, takže každý probit je spojen s procenty odpovědi
- Průměrná odpověď je definována jako probit = 5, všechny probity jsou pozitivní → snazší vizualizace



## b) Probitová transformace křivky dávka-odpověď

~Převedení křivky dávka-odpověď na přímku (lineární  
odpověď)



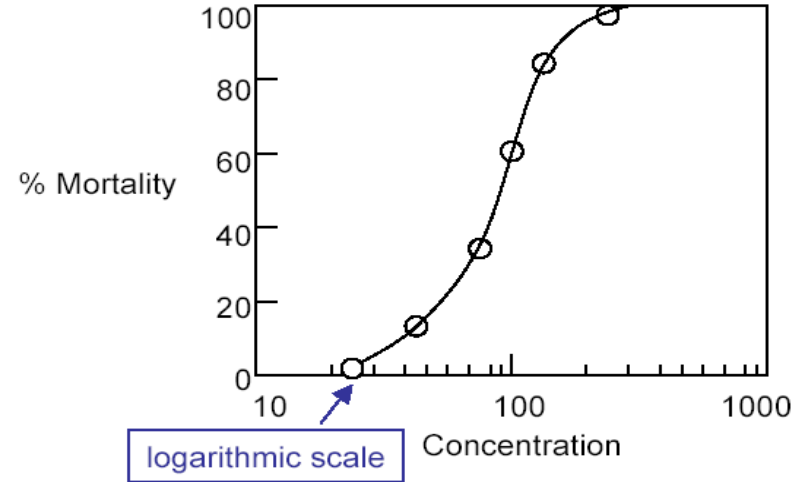
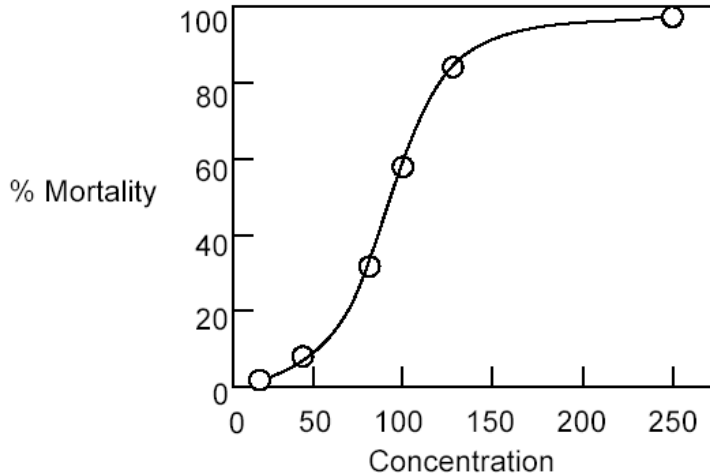
# Tabulka pro probitovou transformaci

%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit	%	probit
0,2	2,122	10,0	3,718	30,0	4,476	50,0	5,000	70,0	5,524	90,0	6,282
0,4	2,348	11,0	3,773	31,0	4,504	51,0	5,025	71,0	5,553	91,0	6,341
0,6	2,488	12,0	3,825	32,0	4,532	52,0	5,050	72,0	5,583	92,0	6,405
0,8	2,591	13,0	3,874	33,0	4,560	53,0	5,075	73,0	5,613	93,0	6,476
1,0	2,574	14,0	3,920	34,0	4,588	54,0	5,100	74,0	5,643	94,0	6,555
1,2	2,743	15,0	3,964	35,0	4,615	55,0	5,126	75,0	5,674	95,0	6,645
1,4	2,803	16,0	4,006	36,0	4,642	56,0	5,151	76,0	5,706	95,5	6,695
1,6	2,856	17,0	4,046	37,0	4,668	57,0	5,176	77,0	5,739	96,0	6,751
1,8	2,903	18,0	4,085	38,0	4,695	58,0	5,202	78,0	5,772	96,5	6,812
2,0	2,946	19,0	4,122	39,0	4,722	59,0	5,228	79,0	5,806	97,0	6,881
2,5	3,040	20,0	4,158	40,0	4,747	60,0	5,253	80,0	5,842	97,5	6,966
3,0	3,123	21,0	4,194	41,0	4,772	61,0	5,278	81,0	5,878	98,0	7,054
3,5	3,188	22,0	4,228	42,0	4,798	62,0	5,305	82,0	5,915	98,2	7,096
4,0	3,249	23,0	4,261	43,0	4,824	63,0	5,332	83,0	5,954	98,4	7,144
4,5	3,305	24,0	4,294	44,0	4,849	64,0	5,358	84,0	5,994	98,6	7,197
5,0	3,355	25,0	4,326	45,0	4,874	65,0	5,385	85,0	6,036	98,8	7,257
6,0	3,445	26,0	4,357	46,0	4,900	66,0	5,412	86,0	6,080	99,0	7,326
7,0	3,524	27,0	4,387	47,0	4,925	67,0	5,440	87,0	6,126	99,2	7,409
8,0	3,595	28,0	4,417	48,0	4,950	68,0	5,468	88,0	6,175	99,4	7,512
9,0	3,659	29,0	4,447	49,0	4,975	69,0	5,496	89,0	6,227	99,6	7,652
										99,8	7,878

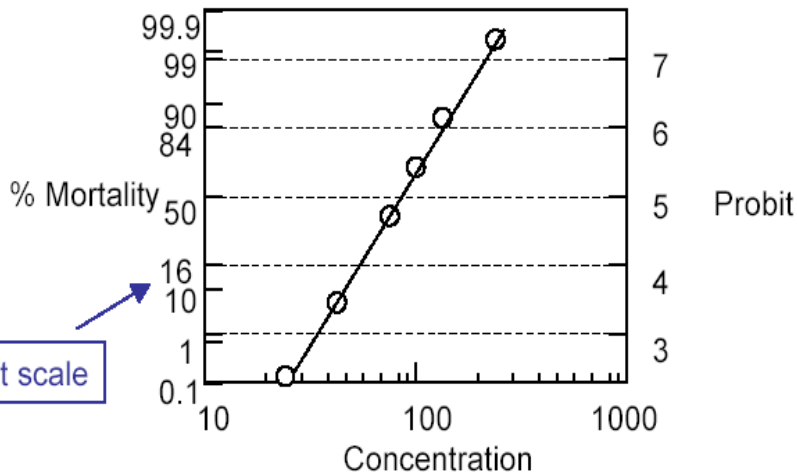
# Příklad probitové analýzy

## Transformace dat : Krok 1 ~ změna osy X na logaritmické měřítko (sigmoidní křivka)

### Výsledek testu: log-normální distribuce



### Transformace dat : Krok 2 ~ převedení % odpovědi na lineární formu probitovou transformací



### Transformace dat : Krok 3 ~ odhad LC50/EC50 hodnoty z přímky lineární regrese

$$Y = a + bX$$

- Y – transformovaný probit,
- X – log(koncentrace),
- b – sklon regresní přímky,
- a – intercept regresní přímky

#### Výpočet EC50 hodnoty:

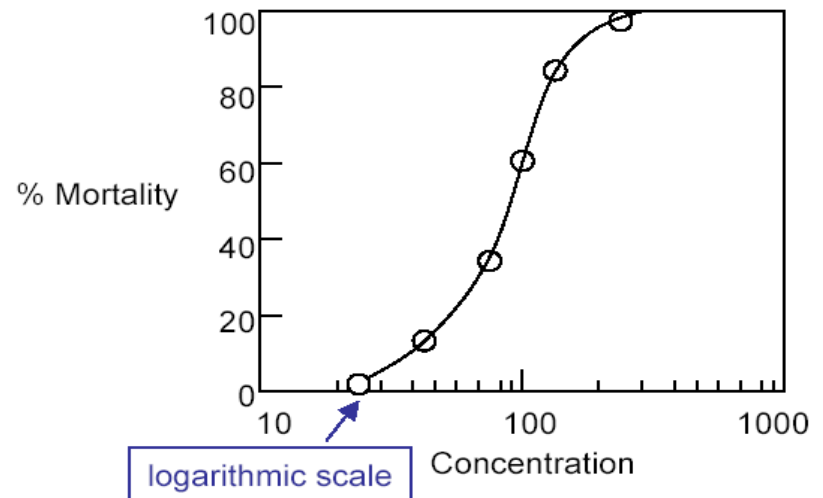
$$5 = a + b \cdot \log(\text{koncentrace})$$

$$\log(\text{koncentrace}) = (5 - a) / b$$

$$\text{koncentrace} = 10^{(5 - a) / b}$$

# Nelineární regrese

- běžný způsob vyhodnocení závislosti dávka-účinek
  - Na hladinách EC50 by se měly nelineární a lineární regrese víceméně shodovat
  - více bodů – lepší nelineární regrese a spolehlivější odvození ECx hodnot
- ~ přímé proložení sigmoidní křivkou a matematický popis nelineárního trendu závislosti dávka-odpověď



# Nelineární regrese

- model je vyjádřen jako rovnice, která definuje  $Y$  (odpověď) jako funkci  $X$  (koncentrace) a jednoho nebo více parametrů
- Velkou výhodou je přesnější odhad nízkých (EC10, EC20) či vysokých (EC80, EC90) hodnot a modelování celých křivek
- Další výhodou je velmi rychlé stanovení hodnoty EC50, protože ta je jedním z parametrů modelu a je tudíž primárním výstupem zmíněných softwarových nástrojů
- Na rozdíl od lineárních regresních modelů je třeba pro správné proložení hodnot nelineárním modelem použít iterativních algoritmů. V naprosté většině případů se používá kritérium minima součtu čtverců odchylek (reziduí). K tomu lze využít modelovacích softwarů (Statistica, GraphPad, SigmaPlot, JMP, R-software)

<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>

<http://www.statsoft.cz/>

<http://www.r-project.org/>

# c) Nelineární regrese

- Nejběžnějším modelem je Hillův model (log-logistický model se 4 parametry) :

$$y = c + (d - c) \frac{x^h}{EC_{50}^h + x^h}$$

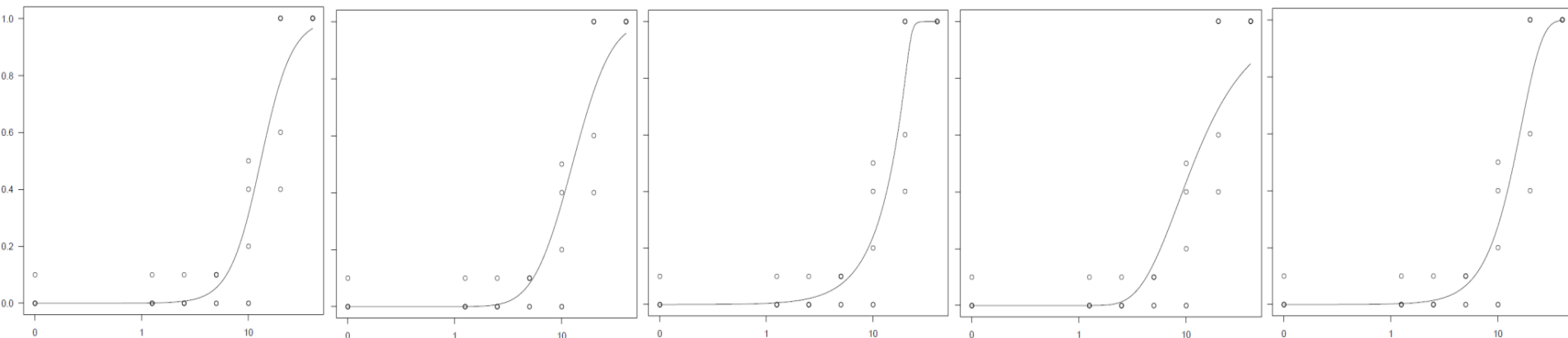
y ... odpověď na toxikant (osa y), EC50 ... EC50 ☺

x ... koncentrace toxické látky (osa x)

h ... sklon křivky v lineární části (tzv. Hill slope)

c ... spodní limit, d ... horní limit

- Existují ale i modely jiné a často i více vhodné, které se mohou lišit v předpovězených hodnotách ECx (např. Weibull I, Weibull II či log-logistický model s 5 parametry)
- V některých případech je vhodné vybrat model jiný podle uvážení či s využitím statistických nástrojů zjistit, který model proloží data lépe (např. AIC – Akaiikovo informační kritérium)



# Využití křivek dávka-odpověď pro hodnocení rizik toxických látek

(látky s prahovým účinkem)



# Využití LC<sub>50</sub>

## 1. Aplikační faktor

- $LC_{50} \times n = \underline{\quad} =$  povolená dávka
- Dobrá pokud nemáme lepší informaci (chronické testy)

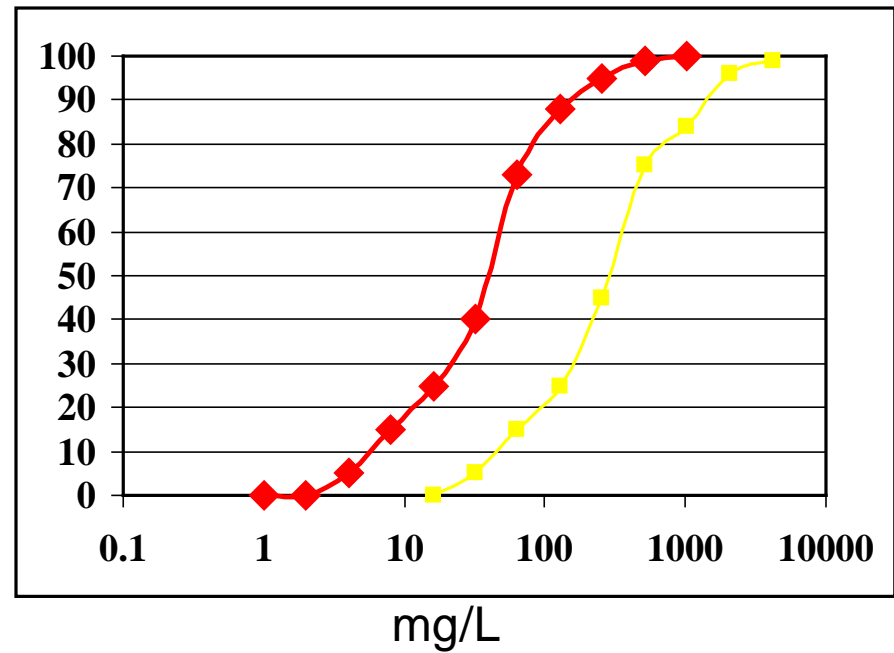
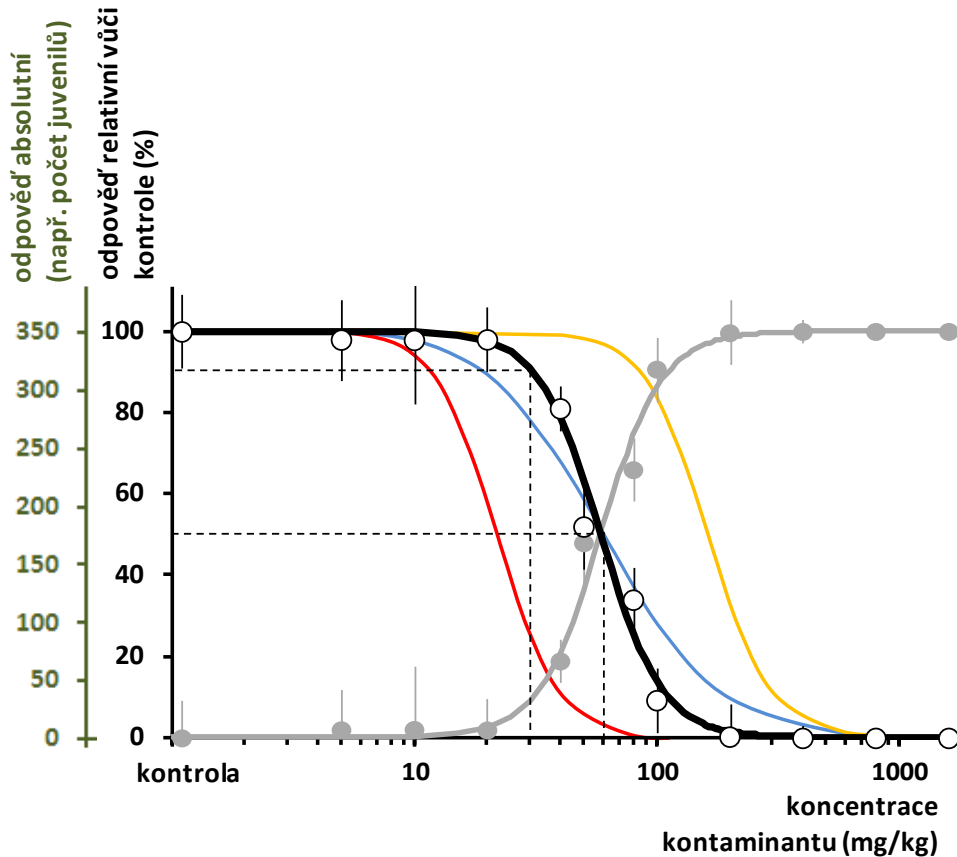
## 2. Zhodnocení rizika → nižší LC<sub>50</sub> = toxičtější

## 3. Vede k chronickému testování

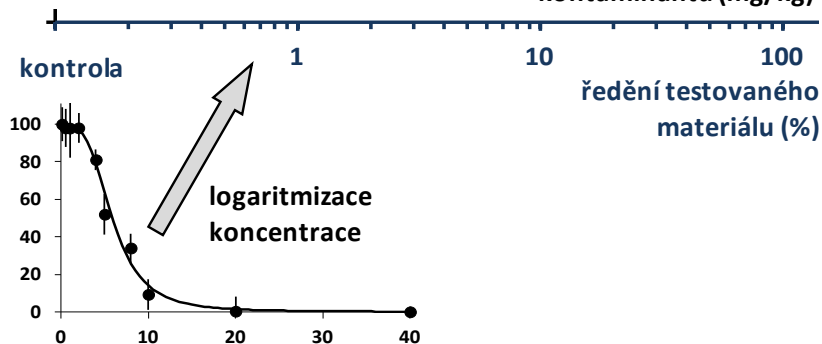
- LC<sub>50</sub> z akutního testu neposkytuje ekologicky relevantní výsledek → potřeba testování na více ekosystémové úrovni



# Srovnání více toxikantů

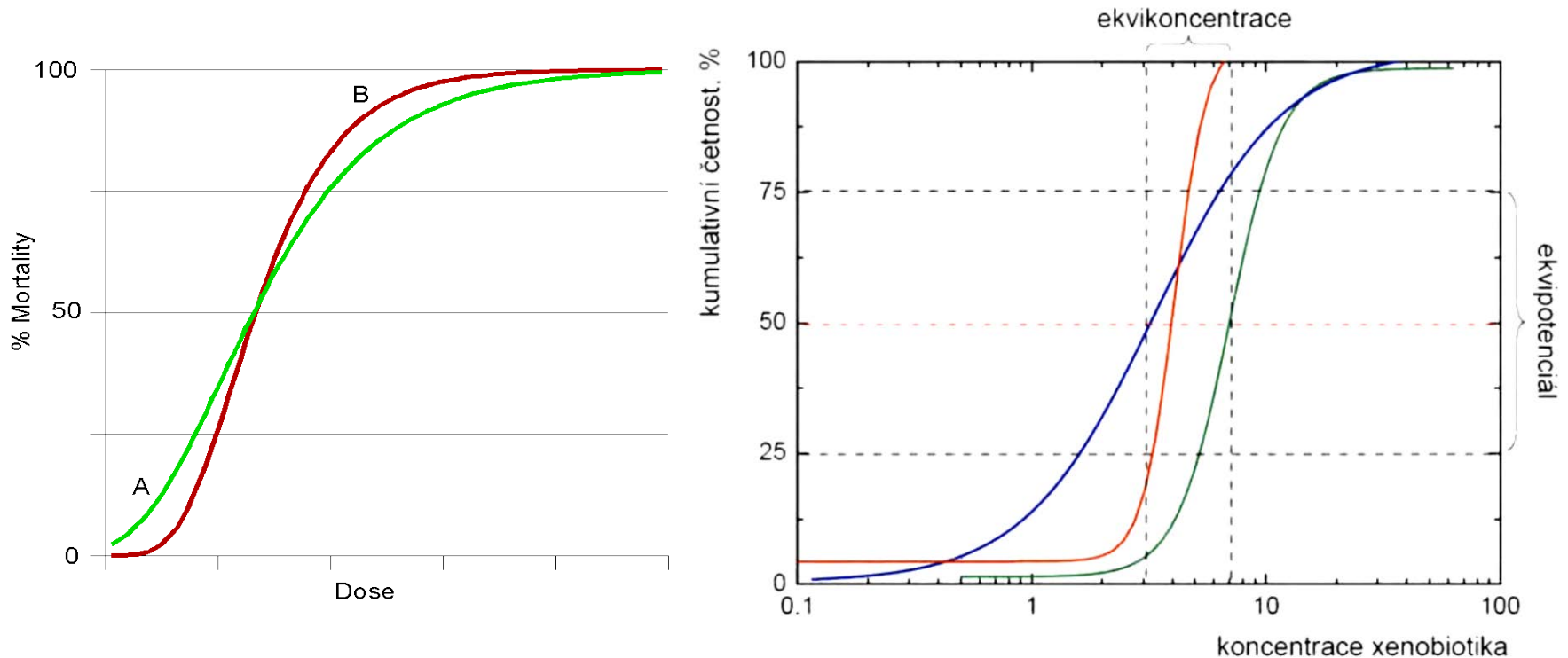


**Látka s odpovědí, kterou zobrazuje červená křivka je toxičtější než ta se žlutou křivkou**



# Srovnání více toxikantů

! Je třeba látky srovnávat nejen podle EC50 hodnot, ale i podle celé křivky!  
(potenciál vs. účinnost toxické látky)



! Důležitý je např. sklon křivky - toxikant s mírným sklonem může být nebezpečný při nízkých koncentracích i když EC50 je vysoká !

# Stanovení bezpečných hladin toxikantů v prostředí

## PNEC

~ „predicted no effect concentration“ (PNEC)

= předpokládaná koncentrace nezpůsobující žádný účinek

→ Identifikace nebezpečnosti: identifikace škodlivých účinků

→ základ k odvozování EQS = Environmental quality standards = limity koncentrací znečišťujících látek v prostředí

# Stanovení bezpečných hladin toxikantů v prostředí

- PNEC:  $PEC < PNEC$ : zajišťuje komplexní ochranu prostředí
- PEC = predicted environmental concentration = očekávaná environmentální koncentrace
- Výpočet PNEC:  
podělení NOEC/NOAEL nebo EC50 přepočtovým faktorem (faktorem nejistoty - UF) za využití statistických extrapoláčních technik
- Přepočtové faktory jsou používány ke zohlednění nejistot

# Stanovení bezpečných hladin toxikantů v prostředí

- Nejistoty:
  - intra- a inter-laboratorní variabilita v toxikologických datech
  - intra- a inter-druhové rozdíly (biologická variabilita)
  - extrapolace z krátkodobých na dlouhodobé testy
  - extrapolace z laboratorních dat na situaci v prostředí (synergistické, aditivní a antagonistické účinky, interakce organismů atd...)

# Stanovení bezpečných hladin toxikantů v prostředí

## Rámcová směrnice EU o vodách:

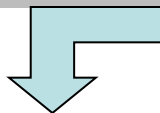
Faktory nejistoty =  
bezpečnostní faktory

Assessment factors to derive a PNEC aquatic

	<b>Assessment factor</b>
At least one short-term L(E)C <sub>50</sub> from each of three trophic levels of the base-set (fish, Daphnia and algae)	1000
One long-term NOEC (either fish or Daphnia)	100
Two long-term NOECs from species representing two trophic levels (fish and/or Daphnia and/or algae)	50
Long-term NOECs from at least three species (normally fish, Daphnia and algae) representing three trophic levels	10 <sup>(c)</sup>
Field data or model ecosystems	Reviewed on a case by case basis
Species sensitivity distribution (SSD method)	5-1, to be fully justified on a case by case basis

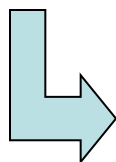
# Extrapolacionní přístupy

**Ekotoxikologická data**



Faktory nejistoty

Data	Assessment factor
L(E)C50 short-term toxicity tests	1000
NOEC for 1 long-term toxicity test	100
NOEC for additional long-term toxicity tests of 2 trophic levels	50
NOEC for additional long-term toxicity tests of 3 species of 3 trophic levels	10



**PNEC**

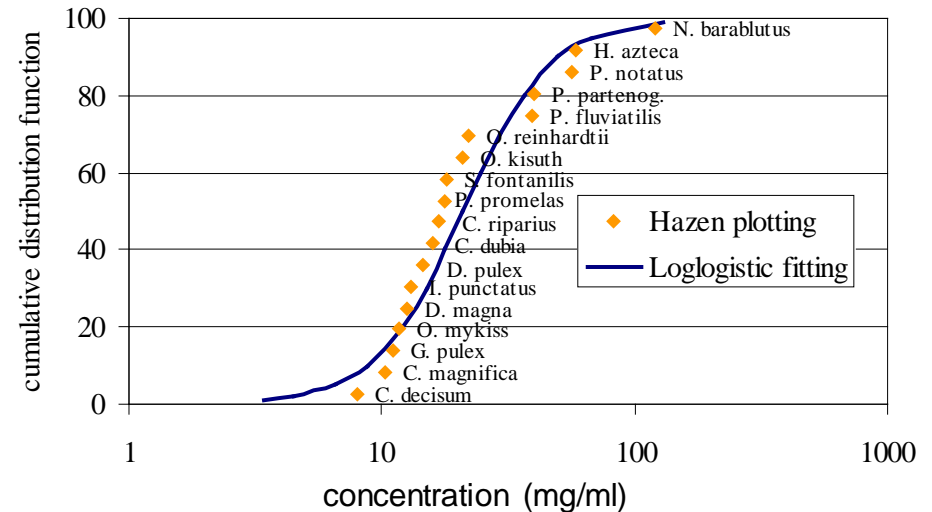
# Extrapoláční přístupy

## Ekotoxikologická data

Faktory nejistoty

Data	Assessment factor
L(E)C50 short-term toxicity tests	1000
NOEC for 1 long-term toxicity test	100
NOEC for additional long-term toxicity tests of 2 trophic levels	50
NOEC for additional long-term toxicity tests of 3 species of 3 trophic levels	10

SSD – Species Sensitivity Distribution  
Křivka rozložení citlivosti druhů



**HC5 = 95% protection level**

**PNEC**

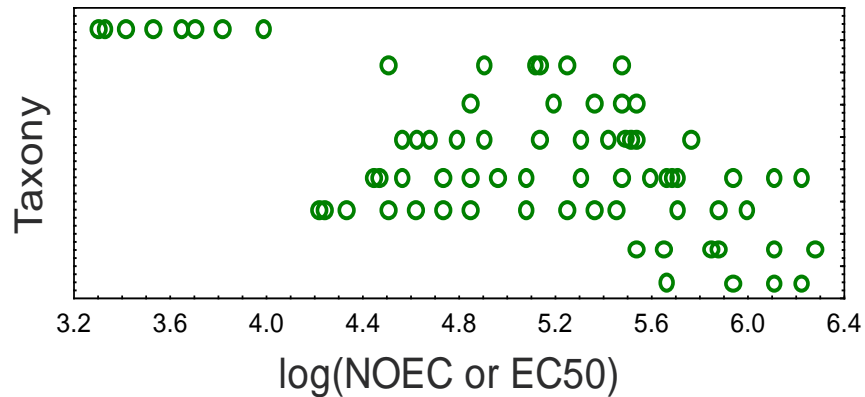
HC5 = Hazardous Concentration for 5% of species



# SSD – Species Sensitivity Distribution

## Rozložení citlivosti druhů

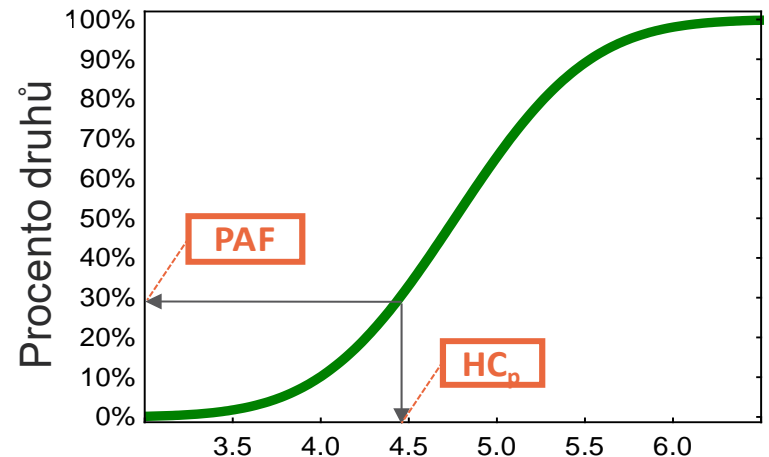
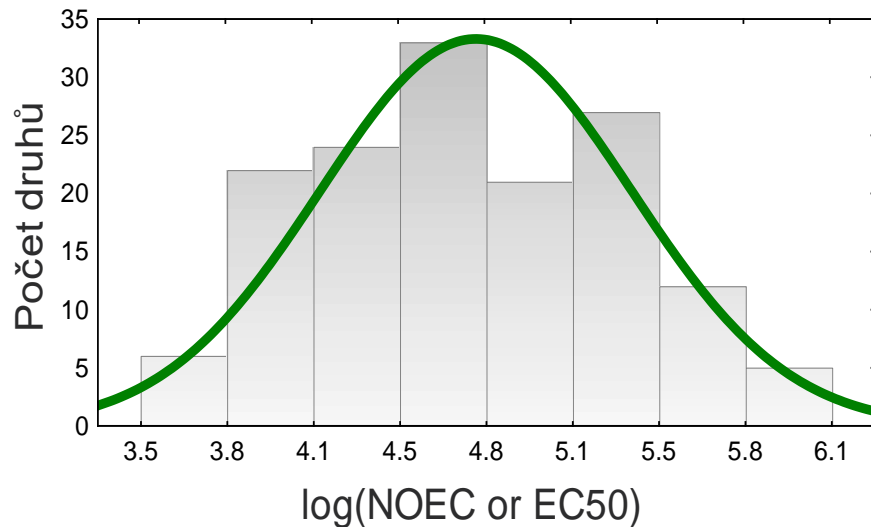
statistická metoda – zohlední dostupná data, např. EC50 více druhů



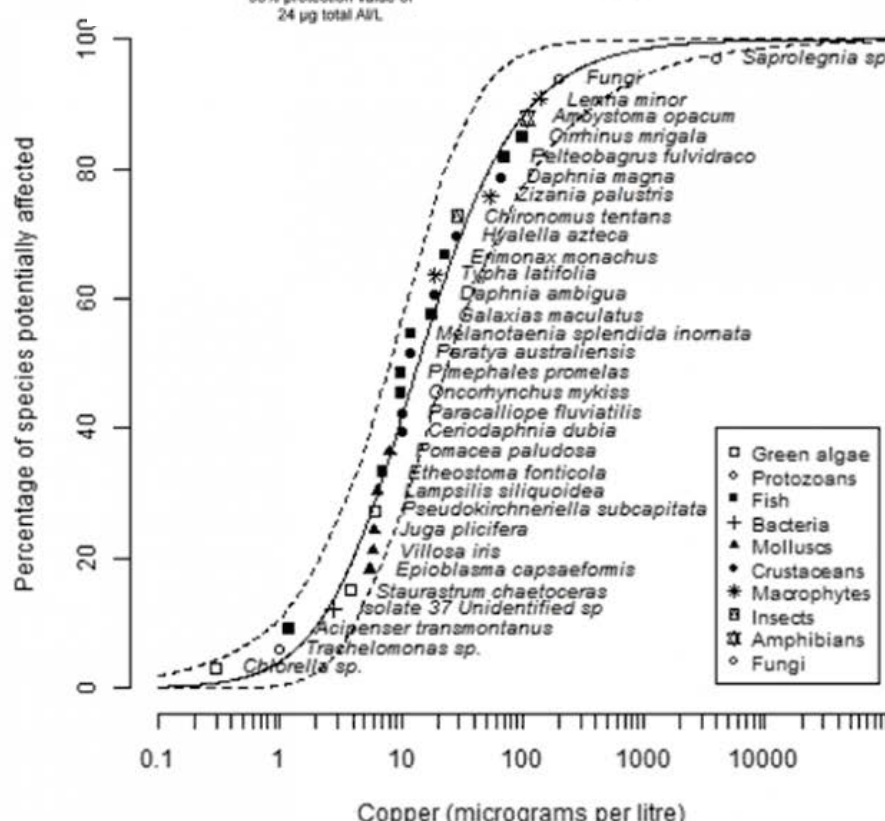
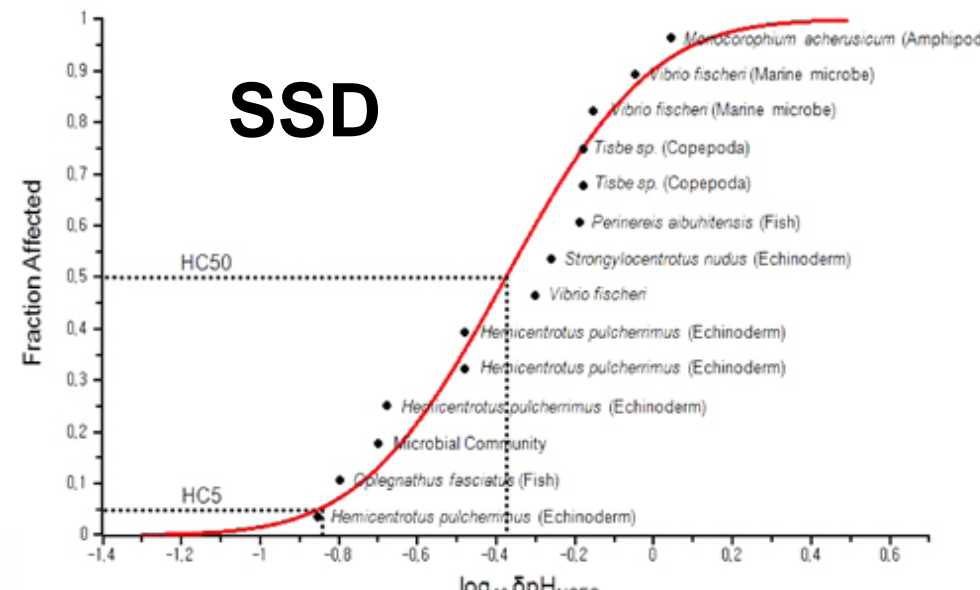
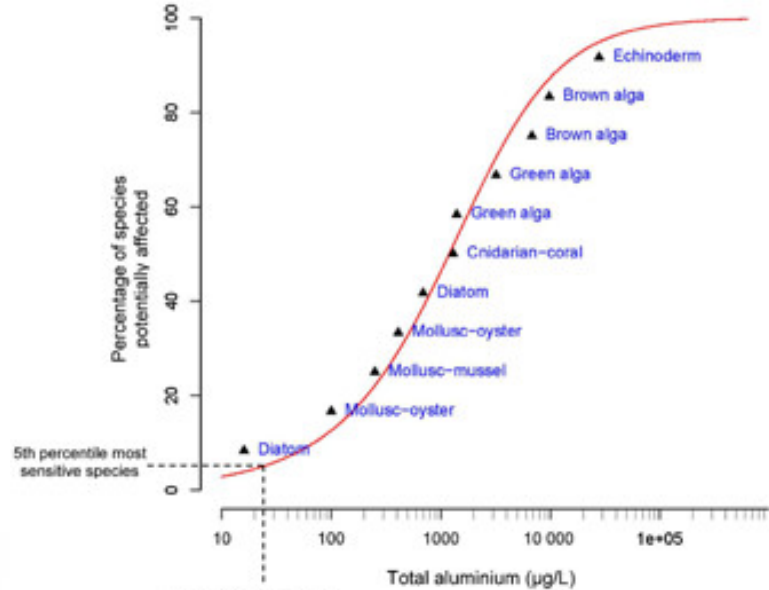
PAF ... Potentially Affected Fraction  
„frakce (procento) organismů, která bude negativně ovlivněna působením určité koncentrace dané toxické látky“

HC<sub>p</sub> ... Hazard Concentration for p-percent of species

koncentrace toxické látky, která podle SSD modelu negativně ovlivní p-procent druhů organismů



Evropa: HC<sub>5</sub> jako limit (~ taková koncentrace látky, která ještě nemá statisticky významný negativní účinek na společenství organismů v ekosystému)

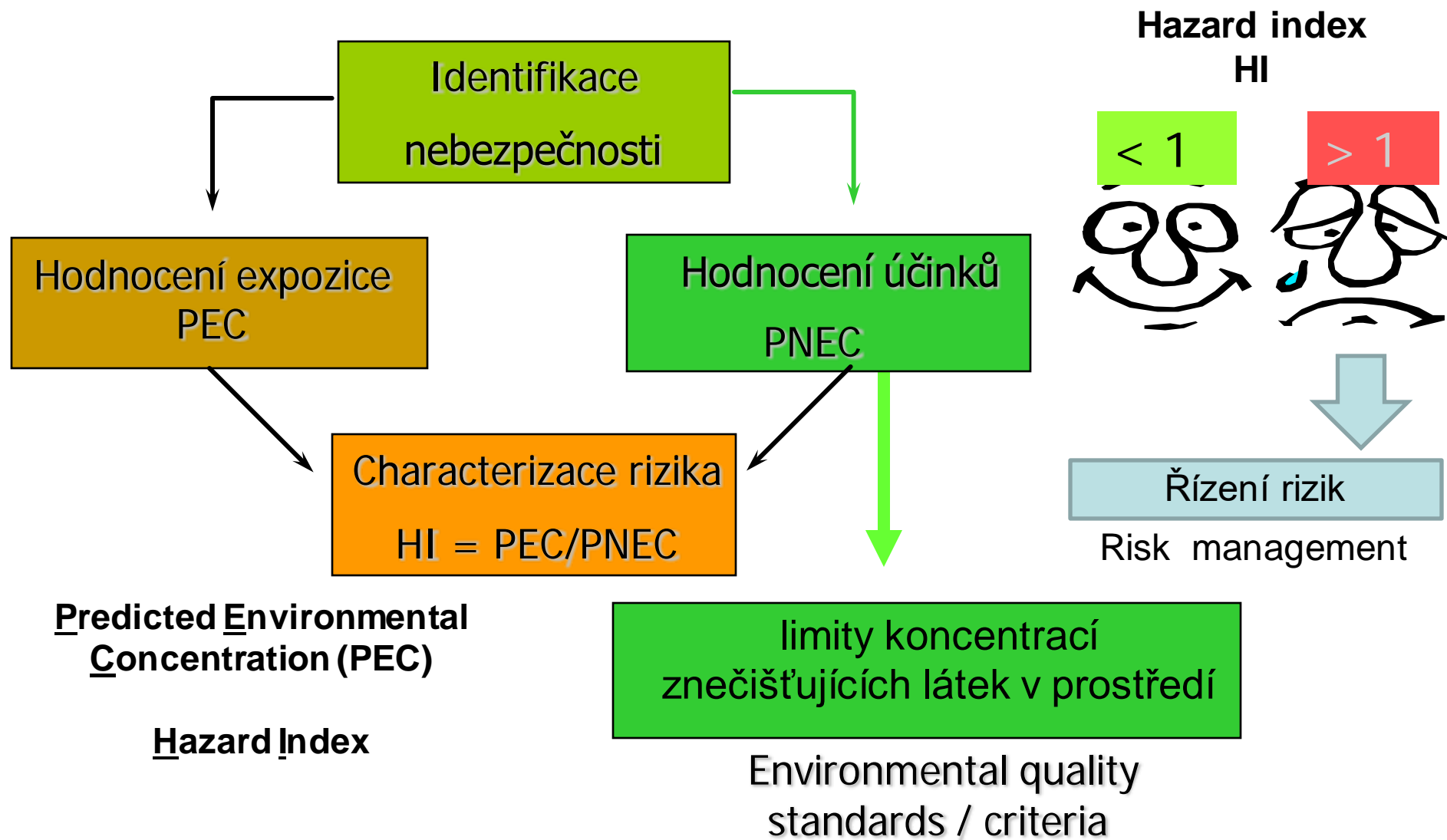


Default guideline value type	Copper (freshwater) toxicity default guideline value ( $\mu\text{g/L}$ ) <sup>a</sup>
<i>Reliability</i>	<i>High reliability</i>
High conservation value systems (99% species protection)	0.35
Slightly to moderately disturbed systems (95% species protection)	1.2
Highly disturbed systems (90% species protection)	2.1
(80% species protection)	4.0

<sup>a</sup> These guideline values apply at DOC 0.5 mg/L.

# Hodnocení a řízení rizik

## Risk assessment & management



# Stanovení bezpečných dávek toxikantů pro člověka

## NOAEL koncept

- Identifikace škodlivého účinku, který se objevuje při nejnižší dávce
- stanovení NOAEL nebo LOAEL pro tento účinek (pro látky s prahovým účinkem se shoduje s hodnotami NOEL a LOEC)
- podělení NOAEL nebo LOAEL bezpečnostními faktory

ADI (acceptable daily intake, akceptovatelný denní příjem): odhadované maximální množství látky, vztažené na tělesnou hmotnost, jemuž může být subjekt vystaven po celý život bez patrného zdravotního rizika (TDI - tolerable daily intake)

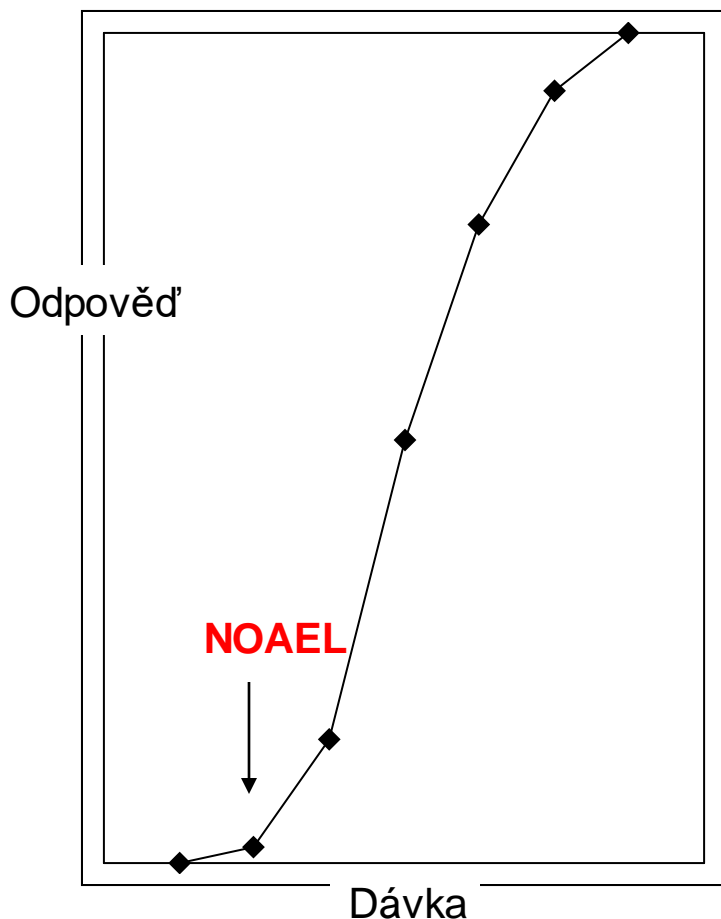
RfD (reference dose, referenční dávka): odhad denní expozice, která je bez patrných zdravotních následků i v případě, že probíhá celoživotně

# Stanovení bezpečných dávek toxikantů pro člověka

## NOAEL (NOAEC)

### **No** **O**bserved **A**dverse **E**ffect **L**evel (Concentration)

~ Nejvyšší testovaná dávka/koncentrace látky, která nezpůsobila škodlivý účinek.



Pod ní může být pozorován účinek, ale není považován za nebezpečný.

**LOAEL (LOAEC): Lowest Observed Adverse Effect Level/Concentration.**

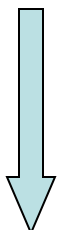
~ Nejnižší testovaná dávka/koncentrace látky, která způsobila škodlivý účinek.

# NOAEL

(dávka/kg ž. hm.)

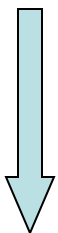


# INTERPRETACE VÝSLEDKŮ Z POKUSŮ NA ZVÍŘATECH



**ADI** = (NOAEL \* standardní váha člověka v kg)/SF

maximální množství reziduí, které může být denně přijímáno v potravě člověka bez zdravotního rizika.



# MLR

maximální limity reziduí (množství/kg poživatiny)



mezidruhové rozdíly

*vrozená citlivost; toxikokinetika*

sledované biologické parametry  
(*imunotoxicita; neurotoxicita*)

převod na člověka

**SF = bezpečnostní faktor**

*snižuje riziko reziduí pro člověka při extrapolaci výsledků toxicity ze zvířat na člověka. Snižuje hodnotu NOAEL 10 – 1 000x dle těchto kritérií:*

- *látky s teratogenním účinkem hodnota 1 000,*
- *nejsou výsledky chronické toxicity SF > 100*
- *údaje z chronické toxicity SF = 100*
- *známy výsledky humánních testů SF = 10*

**rizikové skupiny**

*(individuální citlivost; jednostranná dieta)*

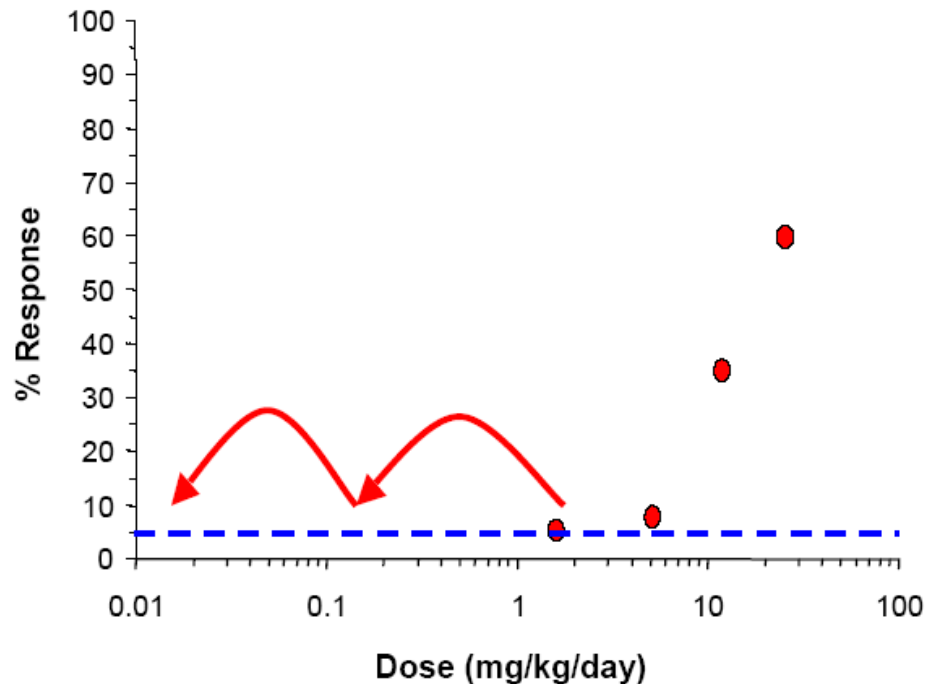
**interakce**

*(chemické složky potravin; ostatní xenobiotika)*

# Stanovení bezpečných dávek toxikantů pro člověka

## ADI z NOAEL

- ADI (nebo RfD) je vypočtena z NOAEL podělením faktory nejistoty (uncertainty factors UFs) nebo bezpečnostními faktory (safety factors SFs)

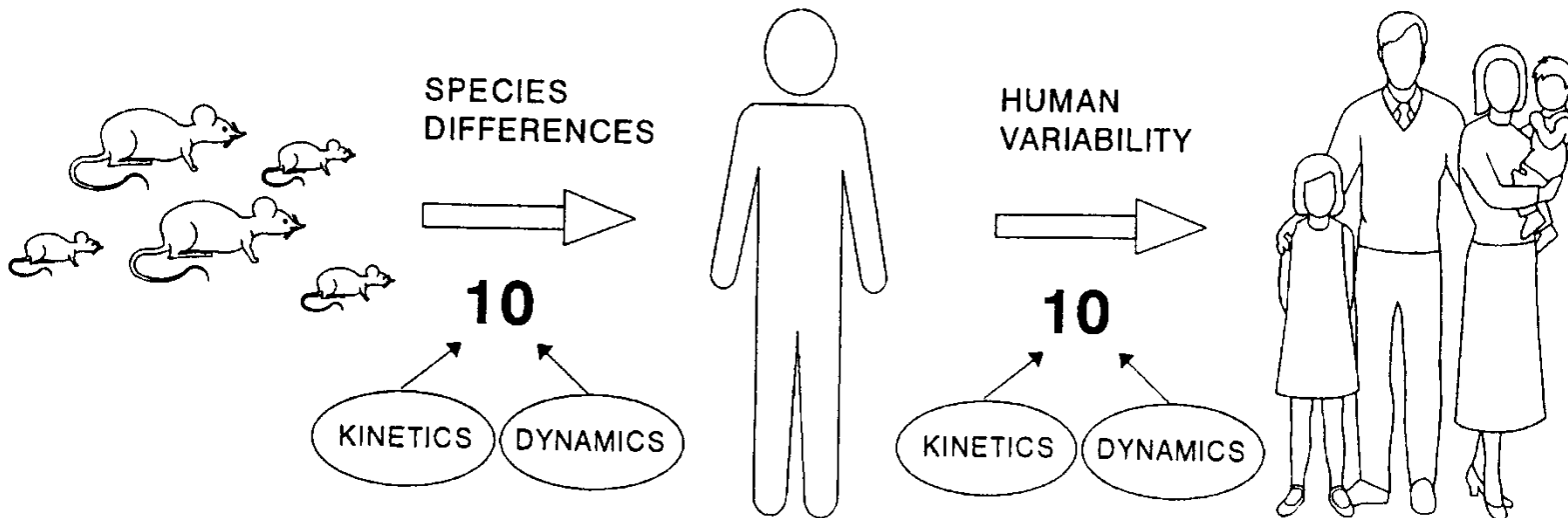


# Stanovení bezpečných dávek toxikantů pro člověka

## Faktory nejistoty - Uncertainty factors

$UF_{\text{mezidruhové rozdíly}} = 10$

$UF_{\text{vnitrodruhové rozdíly}} = 10$





# Stanovení bezpečných dávek toxikantů pro člověka

## Další možné UF

- $UF_{\text{LOAEL-NOAEL}}$  - 3 nebo 10
- $UF_{\text{subchronické-chronické}}$  - 3 nebo 10
- $UF_{\text{nedostatek relevantních informací}}$  - více než 10
- MF – modifikační faktor (expertní stanovisko) – 0.1 – 10 dle spolehlivosti a kvality dat

$$\text{ADI} = \text{NOAEL (or LOAEL)} / UF_1 UF_2 UF_3 \text{ MF}$$

Faktory nejistoty (UF):

<b>10X</b>	human variability
<b>10X</b>	extrapolation from animals to humans
<b>10X</b>	use of less than chronic data
<b>10X</b>	use of LOAEL instead of NOAEL
<b>0.1 - 10X</b>	modifying factor

# Příklad odvození ADI (RfD)

Subchronická studie na zvířatech - LOAEL 50 mg/kg/den

Faktory nejistoty:

- 10 pro variabilitu mezi jedinci (toxikokinetika/toxikodynamika)
- 10 pro mezidruhovou extrapolaci
- 10 pro chybějící data o chronické expozici
- 10 pro použití LOAEL místo NOAEL
- UF = 10 x 10 x 10 x 10

ADI (RfD) = 50 mg / kg/ den/UF = 0.005 mg / kg/ den

<b>10X</b>	human variability
<b>10X</b>	extrapolation from animals to humans
<b>10X</b>	use of less than chronic data
<b>10X</b>	use of LOAEL instead of NOAEL
<b>0.1 - 10X</b>	modifying factor

# Pokud máme data z dlouhodobých (chronických testů)

- Reproductive toxicity (rat): NOAEL = 50mg/kg/d
- Chronic toxicity (rat): NOAEL = 30mg/kg/d
- Carcinogenicity (mice): NOAEL = 10mg/kg/d

ADI = dlouhodobý NOAEL (nejnižší)/100

ADI = 10mg/kg/d /100 = 0.1 mg/kg/d

Pokud 60kg osoba přijme méně než 6mg (60 \* 0.1mg) látky za den, nemělo by to pro ni představovat žádné riziko